

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LARISSA VUITIKA

CLONAGEM, EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DE UMA NOVA
ISOFORMA DE FOSFOLIPASE-D PRESENTE NO VENENO DE ARANHA-
MARROM (*Loxosceles intermedia*)

CURITIBA

2012

LARISSA VUITIKA

CLONAGEM, EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DE UMA NOVA
ISOFORMA DE FOSFOLIPASE-D PRESENTE NO VENENO DE ARANHA-
MARROM (*Loxosceles intermedia*).

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e
Molecular, Programa de Pós-Graduação do
Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga
Co- Orientador (a): Profa. Dra. Olga Meiri Chaim

CURITIBA
2012

Vuitika, Larissa

Clonagem, expressão e purificação de uma nova isoforma de fosfolipase-D presente no veneno de aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*)- Curitiba, 2012. 94p.

Orientador: Prof.º Dr.º Silvio Sanches Veiga

Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Paraná,
Setor de Ciências Biológicas, Curso de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular


1. aranha 2. *Loxosceles intermedia* 3. veneno 4. fosfolipase-D

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

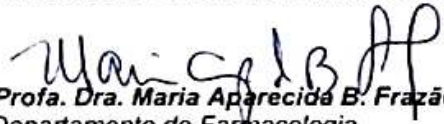
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

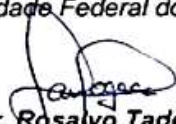
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:



Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR



Prof. Dra. Maria Aparecida B. Frazão Vital
Departamento de Farmacologia
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Rosalvo Tadeu H. Fogaça
Departamento de Fisiologia
Universidade Federal do Paraná

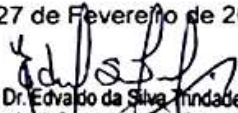
E tendo como suplente,

Prof. Dra. Adriana Frohlich Mercadante
Departamento de Patologia Básica
Universidade Federal do Paraná

Após arguir a mestranda **Larissa Vuitika**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Clonagem, Expressão e Purificação de uma nova isoforma de Fosfolipase-D presente no veneno da aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*)", são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Fevereiro de 2012



Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

*Dedico essa dissertação àquele que chamo carinhosamente de Papai: **Deus!** Obrigada pelo **amor incondicional**. Por ser meu **fiel ouvinte**, por me **ajudar** e estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Obrigada por me conceder **o Dom e o Amor pela Ciência***

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Vilmar e Cristina**. Por me conceder a vida! Por todo amor, dedicação e apoio nessa minha jornada científica. Obrigada pelos valores e por me ensinar a lutar e nunca desistir. Vocês são exemplo de luta e humildade. Amo muito vocês!

Ao meu irmão, **“Ju”**. Por ser mais que um irmão, muitas vezes foi meu filho. Um parceiro, um amigo para todas as horas.

Aos meus primos, **Elaine, Gunnars e Karlis**. Por terem me acolhido como filha e irmã. Vocês foram a minha segunda família nesta jornada. Obrigada de coração!

Agradeço muito ao meu orientador **Profº. Drº. Silvio Sanches Veiga**, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Obrigada pelos ensinamentos científicos e pelo grande exemplo de pesquisador. Minha gratidão será eterna, pois o senhor me concedeu a realização de um sonho: a de chegar perto de tornar-me cientista!

À **Prof. Msc. Ana Carolina Wille**. Por ter reconhecido meus esforços quando eu ainda era graduanda da UEPG. Por ter me indicado a participar do grupo de pesquisa do Prof. Silvio.

À minha co-orientadora **Profª. Drª. Olga Meiri Chaim**. Pela amizade, paciência e pelos ensinamentos. Agradeço principalmente pela paciência! Você é uma mulher brilhante e fascinante. Uma cientista que eu tenho como um exemplo de competência. Obrigada pela co-orientação. Tenho muito orgulho disso!

À minha segunda co-orientadora **Drª. Luiza Helena Gremski**. Simplesmente essa dissertação teve início a partir dos seus esforços. Obrigada

por toda a sua ajuda na bancada, pelos ensinamentos, pela paciência e pelo incentivo.

À minha amiga **Dr^a. Daniele Chaves Moreira**. Pela amizade e companheirismo. Obrigada por nunca ter me deixado desistir. Você é um exemplo de inteligência, dedicação, esforço e amor pela ciência!

À **Prof^a. Dr^a. Andréia Senff Ribeiro** pelo apoio na realização desse trabalho.

À **Msc. Valéria Pereira Ferrer** e **Msc. Dilza Trevizan**. Vocês são exemplo de esforço e persistência. Um exemplo que a dificuldade no trabalho é apenas um estímulo para nunca desistir. Sempre me ajudando e esclarecendo nos momentos que muito precisava.

Aos meus parceiros de mestrado: **Msc. Fernando Hitomi Matsubara, Gabriel Meissner, Daniela Buch, Aline Viana, Adriano Morgon e Matheus Regis Belisário**. Obrigada pela amizade e pela parceria desses anos. Por ter compartilhado todos os momentos alegres e difíceis.

Aos alunos de Iniciação Científica: **Thiago Lopes de MAar, Mariana Bóia, Fernanda Nunes Souza, Marta Oliverio, Marianna Magnoni, Eduardo Soares e Kiane Freitas**. Pela amizade, companheirismo e pela ajuda que muitas vezes foi fornecida de bom gosto.

À coordenação do Curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular pelo empenho e dedicação ao curso.

À secretária do curso de Pós Graduação **Marlene B. de Camargo** pela disposição.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Biologia Celular e do Departamento de Patologia Básica da UFPR pela colaboração, materiais e equipamento emprestados.

Aos amigos do Curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR; aos amigos do Curso de Pós Graduação em Fisiologia da UFPR; aos amigos do Curso de Pós Graduação em Patologia Básica da UFPR; e aos amigos do IBMP.

Agradeço aos meus amigos de longa data: **George, Luiz Eduardo, Luis Henrique, Matheus, Junior e Letícia**. Pelos dez anos de amizade, onde compartilharmos nossos sonhos. Acredito que cada um de nós está onde gostaríamos de estar. Obrigada pelo apoio e torcida, mesmo estando longe uns dos outros. *“Brincar de ser gente grande não é fácil!”*

Agradeço a todo o povo brasileiro, que mesmo sem saberem, contribuíram com o meu trabalho.

À CAPES, CNPq, SETI e Fundação Araucária pelo apoio financeiro aos projetos do laboratório.

*“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima.”*

Louis Pasteur

RESUMO

Loxoscelismo é a denominação do quadro clínico provocado em pacientes picados por aranhas do gênero *Loxosceles*, caracterizado principalmente por causar lesão dermonecrótica com intensa resposta inflamatória no local da picada, e raramente ocorrem manifestações sistêmicas, como distúrbios renais e hematológicos. O veneno loxoscélico é um líquido cristalino e incolor composto essencialmente por proteínas e peptídeos entre 5 a 40kDa, contendo cerca de 30µg de proteínas. Sabe-se que as toxinas da família das fosfolipases-D são capazes de desencadear a maioria dos efeitos biológicos causados pelo envenenamento, tornando-se necessário o aprofundamento da ação completa desta toxina. Algumas isoformas de fosfolipases-D de veneno de aranha-marrom já foram identificadas e biologicamente caracterizadas. Após análise do transcriptoma da glândula produtora de veneno de *Loxosceles intermedia*, algumas prováveis novas isoformas desta toxina foram identificadas e, entre elas, uma se destacou por sua presença em proporção relevante. O objetivo deste trabalho foi a clonagem, expressão heteróloga e purificação desta nova isoforma de toxina dermonecrótica, de modo a permitir sua avaliação biológica por testes *in vitro* e *in vivo*. A partir de técnicas de biologia molecular, foi possível obter a sequência nucleotídica e, por sua vez, aminoácídica completas da LiRecDT7, relatando que esta possui uma substituição conservativa no resíduo de aminoácido Asp233→Glu233. Houve pouco rendimento na expressão da toxina recombinante na forma solúvel e o processo de purificação por cromatografia mostrou-se pouco eficiente. Os testes de atividade esfingomielinásica sugerem que esta toxina como enzima está ativa. Os resultados obtidos até o presente demonstram que esta toxina é uma nova isoforma de fosfolipase-D presente no veneno de *L. intermedia*. Ainda assim, o processo de expressão e purificação devem ser otimizados, para avaliá-la biologicamente, contribuindo para a compreensão da composição do veneno dessa espécie, além de ser mais uma alternativa de ferramenta com potencial de aplicação biotecnológica.

Palavras-chave: aranha, *Loxosceles intermedia*, veneno, fosfolipase-D

ABSTRACT

Loxoscelism is the name of the clinical picture provoked in patients bitten by *Loxosceles* spiders. It is mainly characterized by dermonecrotic lesions with an intense inflammatory response at the site of the bite, and rarely systemic manifestations such as renal and hematological disorders. The venom produced by *Loxosceles* spiders is a crystalline, colorless liquid consisting mainly of proteins and peptides between 5 and 40kDa. It is known that the phospholipase-D family of toxins present in this venom is capable of causing most of the biological effects observed in accidents with the spiders. Some isoforms of phospholipases-D have been identified in the *Loxosceles* venom and biologically characterized. Transcriptome analysis of the venom gland of *Loxosceles intermedia* revealed some potential novel isoforms of this toxin and among them, one stood out for its presence in significant proportion. The aim of this work was the cloning, heterologous expression and purification of this new isoform of dermonecrotic toxin, named LiRecDT7, to allow their biological evaluation by *in vitro* and *in vivo* analysis. Using molecular biology techniques, it was possible to obtain the nucleotide sequence and, in turn, the complete amino acid sequence of LiRecDT7. Further analysis showed a conservative substitution at amino acid residue Glu233→Asp233. The expression of recombinant toxin in soluble form resulted in a low yield and the process of purification by chromatography proved to be inefficient. Nevertheless, preliminary assays that tested the sphingomyelinase activity of LiRecDT7 suggest that this toxin is active as an enzyme. The results show that LiRecDT7 is a new isoform of phospholipase-D present in the venom of *L. intermedia*. Still, the expression and purification process must be optimized to allow further assessments. Thus, the results will help to expand the knowledge concerning the composition of the venom of this species, besides being an alternative tool with potential biotechnological applications.

Key-words: spider, *Loxosceles intermedia*, venom, phospholipase-D

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- ARANHAS DA ESPÉCIE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i>	22
FIGURA 2- LESÃO DERMONECRÓTICA CAUSADA PELA PICADA DE ARANHAS DO GÊNERO <i>LOXOSCELES</i>	24
FIGURA 3- INJÚRIA RENAL CAUSADA PELO LOXOSCELISMO SISTÊMICO. 27	
FIGURA 4- TRANSCRIPTOMA DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i>	30
FIGURA 5- REPRESENTAÇÃO EM FITA E MECANISMO CATALÍTICO DA SMASE I DE <i>LOXOSCELES LAETA</i>	34
FIGURA 6- ALINHAMENTO ESTRUTURAL DE LiRecDT1 E PLD DE <i>LOXOSCELES LAETA</i> E AVALIAÇÃO DA ACESSIBILIDADE DE SOLVENTE NA SUPERFÍCIE DE PLD DAS CLASSES I E II	35
FIGURA 7- PERFIL DO RNA TOTAL ÍNTEGRO OBTIDO POR GEL DE ELETROFORESE DE AGAROSE 1%	57
FIGURA 8- PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE 5' RACE E PCR DE COLÔNIA REFERENTES A SEQUÊNCIA DA LiRecDT7 DE <i>L. INTERMEDIA</i>	58
FIGURA 9- ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DO SEQUENCIAMENTO DO 5' RACE E CONTIG 423.	59
FIGURA 10- CLONAGEM DA PROTEÍNA COMPLETA	66
FIGURA 11- ALINHAMENTO NUCLEOTÍDICO DA LiRecDT7 DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i> E DA ESFINGOMIELINASE-D ALFAIV2 DE <i>LOXOSCELES HIRSUTA</i> (EF535254)	61
FIGURA 12- SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA E AMINOACÍDICA DA ISOFORMA LiRecDT7.	63

FIGURA 13- ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS DA LiRecDT7 E ISOFORMAS RECOMBINANTES DO VENENO DE <i>LOXOSCELES INTERMEDIA</i>	65
FIGURA 14- FILOGENIA DAS TOXINAS DERMONECRÓTICAS CLONADAS DO GÊNERO <i>LOXOSCELES</i> ESTABELECIDAS COM BASE NAS SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS NO BANCO DE PROTEÍNAS (HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV) E NA SEQUÊNCIA OBTIDA DA LiRecDT7	66
FIGURA 15- REPRESENTAÇÃO DO SÍTIO DE CLONAGEM DO VETOR DE EXPRESSÃO pET- 14B	69
FIGURA 16- SUBCLONAGEM DA SEQUÊNCIA MADURA DA LiRecDT7 EM pET-14B.....	70
FIGURA 17- TESTE DE MINI-EXPRESSÃO DA TOXINA LiRecDT7 EM CEPA BACTERIANA BL21(DE3)pLYSS.....	72
FIGURA 18- EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DA TOXINA LiRecDT7 EM CEPA BACTERIANA DE EXPRESSÃO BL21(DE3)pLYSS.....	74
FIGURA 19- TESTE DE SOLUBILIDADE DA TOXINA LiRecDT7 EXPRESSA EM CEPA BACTERIANA BL21(DE3)pLYSS	76
FIGURA 20- TESTE DE MINI-EXPRESSÃO DA TOXINA LiRecDT7 EM CEPA BACTERIANA <i>E. COLI SHUFFLE</i>	77
FIGURA 21- EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DA TOXINA LiRecDT7 EM CEPA BACTERIANA DE EXPRESSÃO SHUFFLE	78
FIGURA 22- PURIFICAÇÃO DA TOXINA LiRecDT7 POR MEIO DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM RESINA Ni ⁺² - NTA AGAROSE	80
FIGURA 23- ENSAIO DE ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA DA LiRecDT7.....	83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Loxosceles</i> ENCONTRADOS NO BRASIL	21
TABELA 2- NOTIFICAÇÃO DE ACIDENTES ENVOLVENDO ARANHAS NO ESTADO DO PARANÁ NO ANO DE 2011.....	29
TABELA 3- ACIDENTES ENVOLVENDO O GÊNERO <i>Loxosceles</i> ENTRE OS ANOS DE 2007 E 2011 NO MUNICÍPIO DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA.....	29
TABELA 4- COMPARAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DAS FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES DE <i>Loxosceles intermedia</i>	38
TABELA 5- REPRESENTAÇÃO DE EST's QUE CODIFICAM PARA A TOXINA DA FAMÍLIA DAS FOSFOLIPASES-D PRESENTE NO VENENO DE <i>Loxosceles intermedia</i>	40
TABELA 6- RELAÇÃO ENTRE A IDENTIDADE DA SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA ENTRE A NOVA ISOFORMA LiRecDT7 E AS ISOFORMAS DESCRITAS PELO GRUPO E A Loxtoxi5 DESCRITAS POR KALAPOTHAKIS <i>et al.</i> (2007).....	65

ABREVEATURAS E SIGLAS

5'- RACE: do Inglês, *Rapid Amplification of 5'cDNA End*

APS : Persulfato de amônio

BLAST: do Inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*

BOD : do Inglês, *Biological Oxygen Demand*

cDNA : DNA complementar

D.O. : Densidade óptica

DEPC: dietilpirocarbonato

DNA : Ácido desoxirribonucleico

dNTPs : Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EDTA : Ácido etilenodiaminotetra-acético

g : Grama

IPTG : Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

IRA: Insuficiência renal aguda.

KCl: Cloreto de potássio

kDa: quilodaltons (unidade de massa molecular equivalente a mil daltons)

L : Litro

LB : Luria-Bertani

M : Mol por litro

mg : Miligrama

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MgSO₄: Sulfato de Magnésio

mL : Mililitro

mM : Milimol por litro

mRNA : RNA mensageiro

NaCl: Cloreto de sódio

nm : Nanômetros

PCR : Reação em cadeia da polimerase

pH : Potencial de hidrogeniônico

pI : Ponto isoelétrico

RNA : Ácido ribonucleico

rpm: rotações por minuto

RT-PCR: transcrição reversa acoplada à reação em cadeia da polimerase

SDS : do Inglês, Dodecilsulfato de Sódio

SDS-PAGE : do Inglês, *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

TAE: tampão Tris-acetato-EDTA

TEMED : N,N,N'N'-dimetilaminoetano

TM: temperatura de desnaturação

UFPR : Universidade Federal do Paraná

V : Volts

v/v: proporção volume/volume

µg : Micrograma

µL : Microlitro

µM : Micromol por litro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Identificação e biologia de aranhas do gênero <i>Loxosceles</i>	22
2.2 Loxoscelismo	22
2.2.1 Loxoscelismo cutâneo/dermonecrótico	24
2.2.2 Loxoscelismo sistêmico	25
2.3 Epidemiologia do loxoscelismo	27
2.4 Veneno loxoscélico	28
2.5 Fosfolipase-D.....	31
3 OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo geral.....	40
3.2 Objetivos específicos	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Animais.....	41
4.2 Extração do RNA total da glândula produtora de veneno de <i>L. intermedia</i>	41
4.3 Quantificação e Análise da Integridade do RNA Total Extraído.....	42
4.4 Transcrição reversa acoplada à reação de polimerase em cadeia ..	42
4.5 Extração dos fragmentos do gel de agarose.....	43
4.6 Reação de adenilação do inserto.....	44
4.7 Ligação em pGEM-T.....	44
4.8 Transformação bacteriana por eletroporação.....	44
4.9 Plaqueamento das bactérias transformadas.....	45
4.10 PCR de colônia.....	45
4.11 Mini preparação plasmidial.....	46
4.12 Reação e análise de sequenciamento.....	46
4.13 PCR de colônia com <i>Pfu</i> polimerase.....	47
4.14 Subclonagem em vetor de expressão pET-14b.....	47
4.15 Análise da sequência da proteína madura.....	48
4.16 Expressão da proteína recombinante LiRecDT7 em <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.....	49
4.17 Expressão da proteína recombinante LiRecDT7 em <i>E. coli</i> Shuffle	50
4.18 Purificação da LiRecDT7.....	52
4.19 Eletroforese de Proteínas em Gel de Poliacrilamida.....	52
4.20 Dosagem de Proteínas por Método de Bradford.....	53
4.21 Ensaio de atividade esfingomielinásica	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1 Extração, quantificação e análise da integridade do RNA	56
5.2 5' RACE (<i>Rapid Amplification of cDNA ends</i>) da sequência da	

LiRecDT7	57
5.3 Clonagem da sequência completa da LiRecDT7	59
5.4 Subclonagem da LiRecDT7	68
5.5 Expressão heteróloga da LiRecDT7	70
5.6 Purificação da LiRecDT7	78
5.7 Ensaio de atividade esfingomielinásica	81
6 CONCLUSÃO	85
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

1 INTRODUÇÃO

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família Sicariidae e são popularmente conhecidas como aranhas-marrons. Possuem distribuição cosmopolita, e no Brasil, encontram-se 11 espécies descritas para este gênero. Dentre essas espécies, apenas três (*L. intermedia*, *L. gaucho* e *L. laeta*) estão envolvidas nos casos de envenenamento humano, justamente pela facilidade em se adaptar ao ambiente intradomiciliar (da SILVA *et al.*, 2004; BINFORD *et al.*, 2008; BERTANI *et al.*, 2010).

O termo loxoscelismo é utilizado para descrever os sinais e sintomas resultantes de acidentes envolvendo aranhas do gênero *Loxosceles* (da SILVA *et al.*, 2004). O envenenamento pode ser caracterizado por duas variantes clínicas: loxoscelismo cutâneo e loxoscelismo sistêmico (FUTRELL, 1992). O quadro cutâneo é mais frequente nos acidentes, caracterizado por uma lesão dermonecrotica que se espalha gravitacionalmente a partir do local da picada. Também é muito comum o surgimento de um halo vermelho com uma zona pálida central circundando a lesão, chamada de placa marmórea (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004). O loxoscelismo sistêmico é menos comum nos acidentes, onde o comprometimento sistêmico, distúrbios hematológicos e renais são as principais causas de morte (da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; de SOUZA *et al.*, 2008).

O veneno loxoscélico é uma mistura essencialmente protéica de compostos biologicamente ativos, e demonstra presença abundante de enzimas em sua composição (da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). O perfil eletroforético revela a presença de maior quantidade de proteínas e peptídeos com massa entre 5-40 kDa (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007; TAMBOURGI *et al.*, 2010). Muitas proteínas que compõem o veneno já foram descritas, entre elas as fosfolipases-D, metaloproteases, hialuronidases, serino-proteases, inibidor de serino-proteases, peptídeos inseticidas TCTP (do inglês *Translationally Controlled Tumor Protein*) e alérgenos (MACHADO *et al.*, 2005; GREMSKI *et al.*, 2010; CHAIM *et al.*, 2011a).

As fosfolipases-D são toxinas de massa molecular de 30-35 kDa (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007), e de todas as toxinas descritas presentes no veneno loxoscélico, estas são as mais bem estudadas e caracterizadas bioquimicamente e biologicamente. Trabalhos mostram que esta toxina, isoladamente, pode reproduzir os principais efeitos e sintomas do loxoscelismo, como: dermonecrose (FUTRELL, 1992, da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005) hemólise (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011) agregação plaquetária (da SILVEIRA *et al.*, 2006a, 2006b; APPEL *et al.*, 2008) distúrbios renais, nefrotoxicidade (LUCIANO *et al.*, 2004; CHAIM *et al.*, 2006; KUSMA *et al.*, 2008), citotoxicidade (CHAIM *et al.*, 2006, KUSMA *et al.*, 2008; CHAIM *et al.*, 2011b) alterações na permeabilidade vascular, edema (da SILVEIRA *et al.* 2006a, 2006b; APPEL *et al.*, 2008) e massiva resposta inflamatória (PALUDO *et al.*, 2009; CHAIM *et al.*, 2011b).

Estas enzimas realizam a hidrólise da esfingomielina com a formação da ceramida-1-fosfato (C1P) e colina, subprodutos envolvidos em importantes fenômenos biológicos (MARCHESINI & HANNUN, 2004). O sítio catalítico é formado por resíduos de aminoácidos que são conservados entre as fosfolipases-D, que são responsáveis pela hidrólise do substrato e pela coordenação do íon metal divalente (Mg^{+2}) (MURAKAMI *et al.*, 2005; MURAKAMI *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2006; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007; GIUSEPPE *et al.*, 2011).

Com o advento das técnicas de biologia molecular e análise proteômica, confirmou-se a presença de um grupo de proteínas homólogas pertencente a uma grande família de toxinas dermonecróticas nos diferentes venenos loxoscélicos (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Nosso grupo já identificou e caracterizou seis isoformas de fosfolipases-D denominadas *Loxosceles intermedia Recombinant Dermonecrotic Toxins* LiRecDT1 (CHAIM *et al.*, 2006), LiRecDT2 e LiRecDT3 (da SILVEIRA *et al.*, 2006a), LiRecDT4 e LiRecDT5 (da SILVEIRA *et al.*, 2006b) e LiRecDT6 (APPEL *et al.*, 2008). A partir desses dados, ampliamos o nosso conhecimento sobre o loxoscelismo, propondo que o efeito geral produzido pelo veneno pode representar a ação sinérgica dessa família de proteínas em conjunto com as outras toxinas. Atualmente, toxinas de veneno tem sido alvo de estudos por

apresentar um grande potencial biotecnológico com aplicações industriais e terapêuticas (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

A partir da análise do transcriptoma das glândulas de veneno de *L. intermedia* (GREMSKI *et al.*, 2010), verificou-se que 20,3% dos transcritos que codificam para toxinas correspondem a fosfolipases-D. Dentre os transcritos, além das isoformas já conhecidas, outras possíveis isoformas foram identificadas. O *cluster* LIC423 e o *singleton* LIS9, que foram descritos na análise do transcriptoma, representam 10,5% entre os transcritos que codificam para fosfolipases-D. A proporção significativa desses transcritos sugere que eles possivelmente representam uma isoforma importante de fosfolipase-D de *L. intermedia* que ainda não foi descrita na literatura. Assim, o objetivo do presente estudo foi caracterizar essa nova toxina, expressá-la como proteína recombinante e investigar suas atividades biológicas, a fim de aprofundar os conhecimentos sobre essa família de proteínas, contribuindo para melhor esclarecimento da composição protéica do veneno e sua atuação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IDENTIFICAÇÃO E BIOLOGIA DE ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles*

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família Sicariidae, subordem Aranemorphae, ordem Araneae, classe Arachnida, subfilo Chelicerata e filo Arthropoda. Atualmente, encontram-se descritas para esta família 100 espécies que estão amplamente distribuídas pelo mundo (PLATNICK VERSION 12.5, 2012). Dentre estas espécies, 20 são endêmicas do continente Africano, 50 da América do Norte e Central e 30 da América do Sul (MARQUES-DA-SILVA, 2005).

No Brasil encontram-se 11 espécies deste gênero (BERTANI *et al.*, 2010), sendo que quatro dessas espécies são encontradas no estado do Paraná (MARQUES-DA-SILVA, 2005). Na Tabela 1, estão demonstradas as espécies de *Loxosceles* encontradas no Brasil e no Paraná.

TABELA 1- ESPÉCIES DO GÊNERO *Loxosceles* ENCONTRADOS NO BRASIL

Aranhas do gênero <i>Loxosceles</i> encontradas no Brasil	
	<i>Loxosceles adelaida</i>
	<i>Loxosceles anômala</i>
	<i>Loxosceles similis</i>
	<i>Loxosceles amazônica</i>
	<i>Loxosceles gauchos*</i>
	<i>Loxosceles hirsuta*</i>
	<i>Loxosceles intermedia*</i>
	<i>Loxosceles laeta*</i>
	<i>Loxosceles porta</i>
	<i>Loxosceles imodesta</i>
	<i>Loxosceles chapadensis</i>

*Espécies de aranhas-marrons encontradas no Estado do Paraná.

As aranhas deste gênero são popularmente conhecidas como aranhas-marrons por apresentarem coloração característica variando de marrom escuro à marrom claro. Também é comum serem chamadas de aranhas violino, por apresentarem um desenho muito parecido com um violino na região dorsal do

cefalotórax (Figura 1A seta). A disposição dos olhos também auxilia na identificação, sendo estes no total de seis agrupados em três díades, dispostos na forma de semicírculo na região dorsal do cefalotórax (Figura 1A pontas de seta) (da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; SWANSON e VETTER, 2006).

Morfologicamente, são aranhas de pequeno porte, possuem comprimento corporal variando de 8 a 15 mm e suas pernas medem de 8 a 30 mm. Possuem dimorfismo sexual, sendo que as fêmeas, normalmente, apresentam o corpo maior e pernas mais curtas em relação aos machos (Figura 1A). Por sua vez, os machos apresentam os palpos com tarsos modificados denominado pedipalpos, estruturas especializadas na transferência dos espermatozóides (GILBERT, 1997). Além disso, não possuem comportamento agressivo e picam somente para se defender, sendo que a maioria dos acidentes ocorre quando comprimidas no corpo no ato de vestir-se, calçar-se, enxugar-se ou durante o sono (FUTRELL, 1992; VETTER e ISBISTER, 2008; ISBISTER & FAN, 2011). Atingem a maturidade sexual a partir do sétimo ínstar e podem viver de 3 a 7 anos (ANDRADE *et al.*, 1999; FISCHER, 2005). Estas aranhas suportam temperaturas variando de 8 a 43°C e podem sobreviver por vários dias, ou até meses, sem água e alimento (FUTRELL, 1992).

São animais sedentários, possuem hábitos noturnos e preferem lugares escuros (da SILVA *et al.*, 2004; CHAIM, *et al.*, 2011a). Em habitat natural, são encontradas dentro de fendas, sob pedras, troncos de árvores e restos de vegetais. Em ambientes sinantrópicos, essas aranhas são encontradas em caixas de papelão, atrás de estantes, armários e quadros; também são encontrados em entulhos, dentro de sapatos e roupas (VETTER e ISBISTER, 2008).

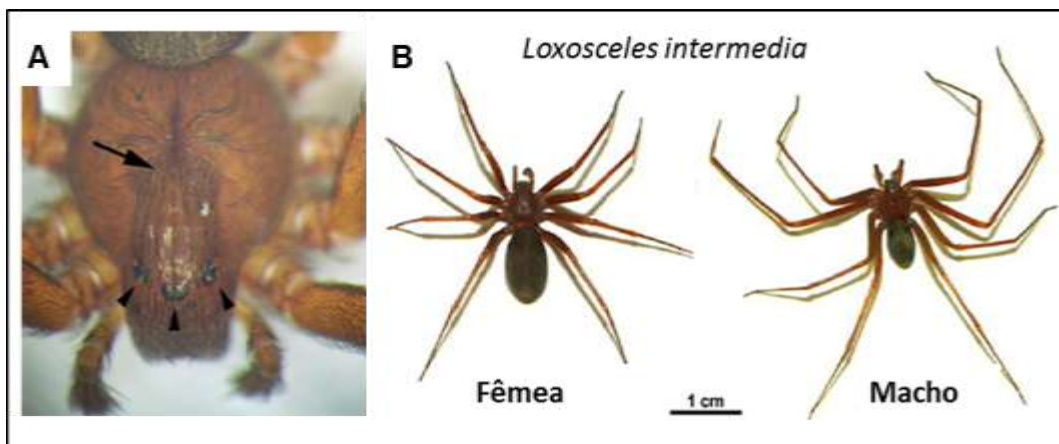


FIGURA 1- ARANHAS DA ESPÉCIE *Loxosceles intermedia*. (A) Desenho muito semelhante à de um violino na região dorsal do cefalotórax (seta); os seis olhos agrupados em díades dispostos em semicírculo na região dorsal do cefalotórax (pontas de seta). (B) Aranhas adultas de *Loxosceles intermedia*, demonstrando o dimorfismo sexual entre fêmeas (esquerda) e machos (direita). Adaptado de: CHAIM *et al*, 2011a.

As aranhas-marrons possuem distribuição cosmopolita, estando presentes nas Américas, Europa, África e Oceania (da SILVA *et al.*, 2004; BINFORD *et al.*, 2008). No entanto, observa-se uma concentração maior das espécies no continente da África e da América do Sul, sugerindo que os gêneros *Sicarius* e *Loxosceles* são grupos monofiléticos, tendo provável ancestral comum na Gondwana Ocidental antes da separação dos continentes africano e sul-americano (BINFORD *et al.*, 2008; CHAIM *et al.*, 2011a).

2.2 LOXOSCELISMO

Denomina-se loxoscelismo o conjunto de eventos clínicos desenvolvidos em pacientes picados por aranhas do gênero *Loxosceles*, que pode se manifestar na forma cutânea e/ou sistêmica (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004, APPEL *et al.*, 2005, TAMBOURGUI, *et al.*, 2010, CHAIM *et al.*, 2011a).

A gravidade e o desenvolvimento de determinado quadro clínico depende de vários fatores como: a espécie de aranha-marrom, (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2005), do sexo da aranha, (OLIVEIRA *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2005), e do estágio de desenvolvimento da aranha (ANDRADE *et al.*, 1999). Além disso, dependerá da quantidade de veneno

inoculado, das características genéticas do indivíduo como: o estado nutricional da vítima, local da picada, susceptibilidade ao veneno e o tempo que o acidentado leva para receber o tratamento correto (BARBARO *et al.*, 1994; TAMBOURGUI *et al.*, 2010).

Além disso, foi identificada nas quelíceras e no veneno de *L. intermedia*, a presença da bactéria gram positiva anaeróbica *Clostridium perfringens*. Experimentos em coelhos sugerem que a presença desta bactéria pode potencializar o efeito dermonecrótico causado pela ação do veneno, sendo um importante agente causador de infecção secundária causada pela picada (MONTEIRO *et al.*, 2002).

Diversas intervenções e medicamentos são propostos para o tratamento do envenenamento. Entre eles está a utilização de soroterapia, corticóides e dapsona (HOGAN *et al.*, 2004). Além disso, podem ser feitas compressas frias no local da picada, analgésicos, antissépticos e antibióticos, em caso de infecções secundárias. Nos casos mais graves, pode ocorrer a necessidade de intervenções cirúrgicas, enxerto e transfusão de sangue. O uso de dapsona é muito comum, pois limita a possibilidade de imigração e infiltração de neutrófilos no local da picada, além de promover importante redução da escara e da necrose (PAULI *et al.*, 2006). A soroterapia é somente utilizada nos casos mais graves de loxoscelismo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001), neutralizando a circulação do veneno e diminuindo o risco de complicações sistêmicas como, hemólise, falência renal e coagulação intravascular disseminada (PAULI *et al.*, 2006). Estudos com coelhos que foram experimentalmente envenenados com veneno total de *L. intermedia*, *L. laeta* e *L. gaucho*, foram tratados com soro antiloxoscélico. Os resultados mostram que o soro diminuiu os efeitos do envenenamento, tanto dermonecrótico como sistêmico, quando aplicado em até 12h após a injeção do veneno. Assim, o soro antiveneno mostra-se útil como uma importante ferramenta para o tratamento do loxoscelismo (PAULI, *et al.*, 2009).

2.2.1 Loxoscelismo cutâneo /dermonecrótico

O quadro cutâneo, também chamado de loxoscelismo dermonecrótico, possui como principal característica o surgimento de uma lesão necrótica que se espalha gravitacionalmente a partir do local da picada. Esta lesão é pouco dolorosa e passa despercebida pelo paciente. Algumas horas depois da picada pode surgir dor, variando de moderada a severa, caracterizada por ser uma dor local e do tipo “queimação”. Em seguida, pode surgir circundando a lesão um halo vermelho com uma zona pálida central, chamada de placa marmórea (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005) (Figura 2A)

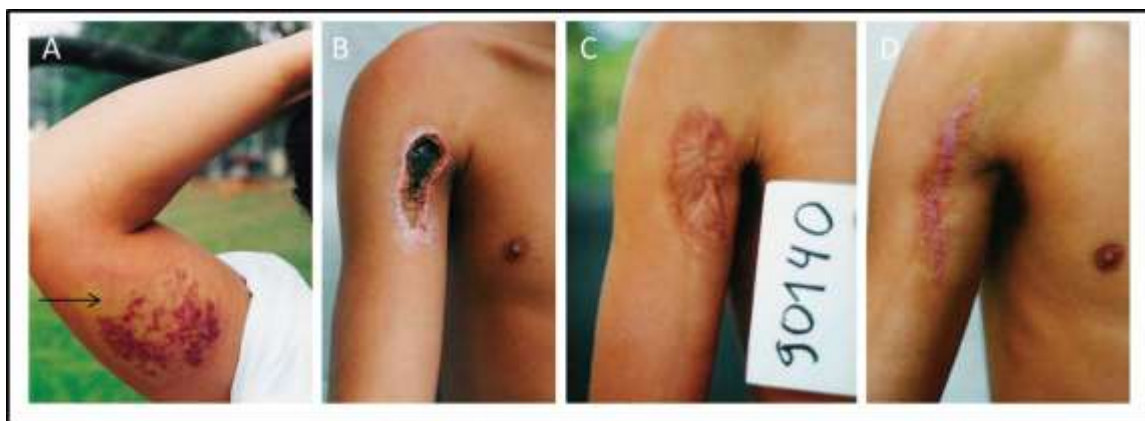


FIGURA 2- LESÃO DERMONECRÓTICA CAUSADA PELA PICADA DE ARANHAS DO GÊNERO *Loxosceles*. (A) Após 48h, surge no local da picada edema, eritema e a placa marmórea (seta). (B) Formação de escara após 26 dias após o acidente. (C) Cicatriz no local da picada após 116 dias. (D) Três anos após o acidente. Adaptado a partir de: HOGAN *et al.*, 2004.

Quando sem tratamento, a lesão evolui para uma ferida rígida que pode expor uma escara de difícil cicatrização ao longo do tempo (Figura 2B) (APPEL *et al.*, 2005). A úlcera resultante é geralmente dolorosa e lenta para cicatrizar, às vezes se estendendo por alguns meses (Figura 2C) (ISBISTER *et al.*, 2004). Dependendo da evolução deste quadro, uma cirurgia plástica reparadora pode ser necessária para remoção do tecido necrosado (Figura 2D) e substituição por enxerto (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004).

Biópsias de pele de pacientes que sofreram acidente com a picada de aranha-marrom revelam dados histopatológicos como: infiltração inflamatória,

edema, eritema, hemorragia, endurecimento da região lesionada, coleção de células inflamatórias, coagulação intravascular, acúmulo de leucócitos polimorfonucleares, necrose liquefativa da derme/epiderme e formação de abscesso (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). Análises histopatológicas de pele de coelho em condições experimentais demonstram uma intensa acumulação de células inflamatórias com a massiva diapedese de neutrófilos, deposição de fibrina nos vasos sanguíneos danificados e a desorganização nas fibras de colágeno (CHAIM *et al.*, 2011b).

2.2.2 Loxoscelismo sistêmico

Algumas vítimas podem desenvolver a forma mais grave do loxoscelismo, o qual corresponde ao quadro cutâneo-visceral ou também denominado de loxoscelismo sistêmico. Este quadro é menos comum, no entanto, em alguns casos, o comprometimento sistêmico, distúrbios hematológicos e renais são as principais causa de morte (da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; de SOUZA *et al.*, 2008).

Os sintomas são: astenia, episódios eméticos, alterações sensoriais, cefaléia, abnulação, convulsões e coma (FUTRELL, 1992). Nos casos mais graves, as alterações no quadro hematológico incluem anemia hemolítica, trombocitopenia decorrente da agregação plaquetária e coagulação intravascular disseminada (CIVD) (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004; LUCIANO, *et al.*, 2004; TAMBOURGUI *et al.*, 2010). Por conseguinte, tais alterações podem acarretar em relevante redução do hematócrito, aumento de bilirrubina indireta, icterícia, petéquias, esquimoses e hemoglobinúria (PETERSON, 2006).

A insuficiência renal aguda (IRA), também é uma grave complicação do quadro sistêmico, muitas vezes podendo refletir desordens hematológicas como hemólise intravascular e coagulação intravascular disseminada. Sabe-se que a injúria renal é causada pela ação direta das toxinas do veneno nos túbulos renais, células endoteliais, glomérulos e na membrana basal (LUCIANO *et al.*, 2004). Em condições experimentais, camundongos expostos ao veneno

total de *L. intermedia* demonstraram um alto grau de nefrotoxicidade, revelando colapso glomerular e da membrana basal. Observa-se também hialinização e vacuolização dos túbulos distais e proximais, edema intersticial, bem como a presença de eritrócitos no espaço de Bowman (da SILVA *et al.*, 2004; LUCIANO *et al.*, 2004) (Figura 3).

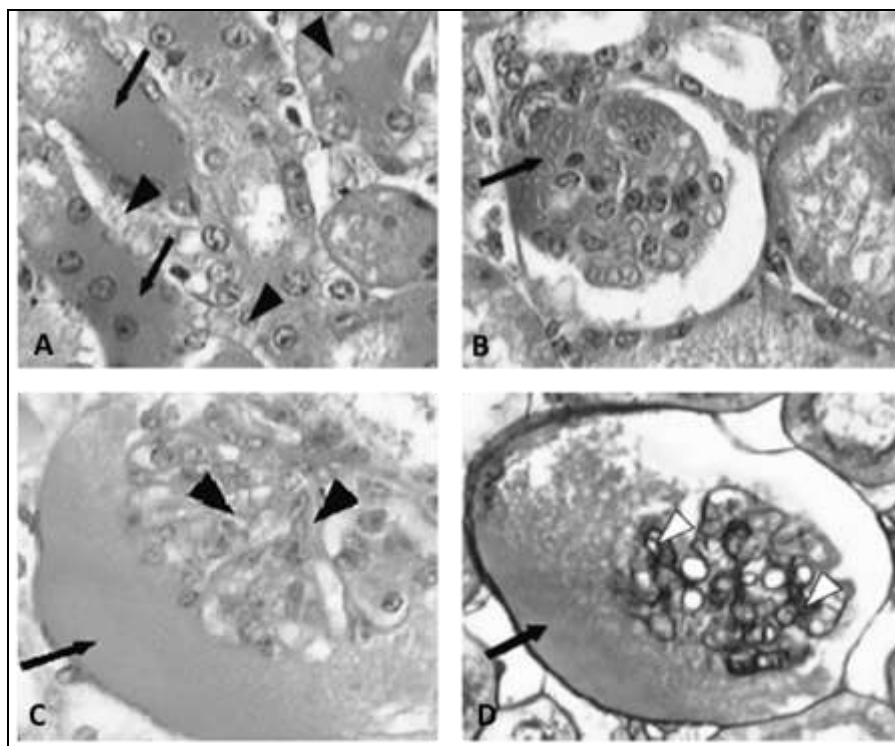


FIGURA 3- INJÚRIA RENAL CAUSADA PELO LOXOSCELISMO SISTÊMICO. Microscopia de luz mostrando rins de camundongos tratados com o veneno bruto de *L. intermedia*. (A) Detalhe dos túbulos renais mostrando acúmulo de material eosinofílico no lúmen do túbulo (setas) e formação de vacúolos nas células endoteliais (pontas de seta). (B) Presença de eritrócitos no espaço de Bowman (setas). (C e D) Colapso da membrana basal (pontas de seta) e deposição de material proteináceo no espaço de Bowman (setas). Adaptado a partir de: LUCIANO *et al.*, 2004.

Sabe-se que o veneno de *L. intermedia* tem atividade entactinolítica e degrada o domínio protéico do proteoglicano de heparan sulfato, considerado um importante constituinte molecular encontrado nas membranas basais, estruturas fundamentais nos glomérulos renais, envolvidos na formação da urina (VEIGA *et al.*, 1999; LUCIANO *et al.*, 2004). Neste contexto, estudos realizados *in vivo* e *in vitro* utilizando camundongos e linhagem celular MDCK

(células de epitélio renal canino), mostraram que as toxinas do veneno de *L. intermedia* apresentam atividade nefrotóxica direta e dependente da atividade catalítica de fosfolipase-D sobre o tecido renal (CHAIM *et al.*, 2006; KUSMA *et al.*, 2008).

Estudos recentes com veneno de *L. gaucha* em camundongos (LUCATO *et al.*, 2011), mostram que o veneno pode causar lesão renal e rabdomiólise, sendo que os possíveis fatores que contribuem para a lesão renal foram a vasoconstrição renal e mioglobínúria. Além disso, neste trabalho não foram observados coagulação intravascular disseminada, isquemia e toxicidade em células endoteliais. Estas diferenças podem explicar a variação na letalidade do veneno de diversas espécies do gênero *Loxosceles*.

2.3 EPIDEMIOLOGIA DO LOXOSCELISMO

Acidentes causados por aranhas do gênero *Loxosceles* têm sido descritos desde a década de 1950 (ROSEVELD *et al.*, 1957; ATKINS *et al.*, 1958). Atualmente, o loxoscelismo é considerado a forma mais importante de araneísmo no Brasil devido ao alto número de acidentes notificados no sul e sudeste do país, onde as espécies *L. gaucha*, *L. laeta* e *L. intermedia* são as espécies principalmente encontradas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

No Brasil, segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde (SINAN), dos acidentes araneídeos (acidentes causados por aranhas dos gêneros *Phoneutria*, *Loxosceles*, *Lactrodectus* e outras aranhas) notificados entre 2001 e 2008 (n= 138.153), 42,6% dos casos (n= 58.823) são atribuídos a aranhas do gênero *Loxosceles* (SINAN, 2012).

No ano de 2011, o SINAN registrou no Estado do Paraná, 10.248 acidentes com aranhas reconhecidas, sendo que aproximadamente 40% dessas ocorrências estão associados a aranhas do gênero *Loxosceles* (Tabela 2). De acordo com dados fornecidos pela Secretaria Estadual de Saúde do Paraná, 4693 acidentes com aranhas do gênero *Loxosceles* foram registrados no ano de 2010 no município de Curitiba e Região Metropolitana. Dados mais recentes relatam 2.990 casos no ano de 2011 (Tabela 3). Dada a alta

incidência de acidentes, Curitiba e Região Metropolitana são consideradas áreas endêmicas para os acidentes com as aranhas do gênero *Loxosceles*.

TABELA 2- NOTIFICAÇÃO DE ACIDENTES ENVOLVENDO ARANHAS NO ESTADO DO PARANÁ NO ANO DE 2011. Dados parciais atualizados em 02/01/2012. Fonte: Ministério da Saúde/SVS/SINAN.

Estado	Ignorados/Branco	<i>Phoneutria</i>	<i>Loxosceles</i>	<i>Lactrodectus</i>	<i>Outra espécie</i>	Total
Paraná	5.095	1.046	4.103	4	2.020	12.268

TABELA 3- ACIDENTES ENVOLVENDO O GÊNERO *Loxosceles* ENTRE OS ANOS DE 2007 E 2011 NO MUNICÍPIO DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA. Dados parciais até 7 de dezembro de 2011. Fonte: SESA/DEVA/DVVZI.

Ano	Curitiba	Região Metropolitana	Total
2007	2894	2844	5738
2008	2085	3917	6002
2009	2261	4048	6309
2010	1710	2983	4693
2011	1032	1958	2990

2.4 VENENO LOXOSCÉLICO

Aranhas do gênero *Loxosceles* utilizam o veneno para imobilizar suas presas, mas também podem utilizá-lo como um mecanismo de defesa quando comprimidas, motivo pelo qual ocorrem acidentes com seres humanos. A utilização do veneno pelas aranhas parece ter sido um acontecimento precoce na história evolutiva desta ordem. A grande função do veneno é paralisar e matar a presa, além de iniciar a digestão externa da presa. A função de defesa contra predadores também não pode ser descartada, uma vez que algumas aranhas só injetam o veneno quando em perigo. Todas as aranhas, com exceção da família Uloboridae, possuem todo o aparato para produção e

injeção de veneno geralmente composto por proteínas com ação tóxica e enzimática, além de peptídeos e compostos orgânicos e inorgânicos (RASH e HODGSON, 2002).

O veneno loxoscélico é um líquido cristalino e incolor, de natureza essencialmente protéica, produzido por um par de glândulas situadas no cefalotórax, ligadas a um par de quelíceras (dos SANTOS *et al.*, 2000). Os venenos de *L. laeta*, *L. intermedia*, *L. gauchoi* e *L. reclusa* possuem perfil eletroforético similar, apresentando maior concentração das bandas entre 30 e 35 kDa (MOTA e BARBARO, 1995; BARBARO *et al.*, 1996). A quantidade de veneno produzida é variável entre as espécies de aranha-marrom, de acordo com o tamanho e sexo do animal, entre outros fatores (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Aranhas adultas do gênero *Loxosceles* inoculam um volume de apenas alguns microlitros na vítima, contendo cerca de 30 µg de proteínas (TAMBOURGI *et al.*, 2010).

Muitos estudos focam na identificação dos constituintes dos venenos loxoscélicos e, portanto, algumas das toxinas presentes no veneno já estão bem caracterizadas bioquímica e biologicamente (da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). Já foram descritas enzimas como fosfatase alcalina, 5' ribonucleotídeo fosfohidrolases (FUTRELL, 1992), peptídeos com atividade inseticida (de CASTRO *et al.*, 2004), hialuronidases (da SILVEIRA *et al.*, 2007b), fosfolipases-D (de ANDRADE *et al.*, 2005; CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006a e 2006b; APPEL *et al.*, 2008), serino-proteases (VEIGA *et al.*, 2000), inibidor de serino-proteases, (GREMSKI *et al.*, 2010), lectina do tipo C, alérgenos (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008; dos SANTOS *et al.*, 2008) e metaloproteases (FEITOSA *et al.*, 1998; da SILVEIRA *et al.*, 2007a; TREVISAN-SILVA *et al.*, 2010). Muitos autores sugerem que a toxicidade do veneno de aranha-marrom é decorrente de efeitos danosos sinérgicos e/ou somatórios de todos os seus componentes (GEREN *et al.*, 1976; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005).

Recentemente, Gremski e colaboradores (2010) estudaram o perfil de transcritos da glândula produtora de veneno de *L. intermedia*. Como demonstrado na Figura 4A, aproximadamente 43,5% dos transcritos correspondem a toxinas. Dentre eles, podemos observar, como já descrito

acima, a presença de fosfolipases-D, peptídeos inseticidas, neurotoxinas, serino-proteases, TCTP, alérgenos, hialuronidase, inibidor de serino-proteases e metaloproteases (Figura 4B).

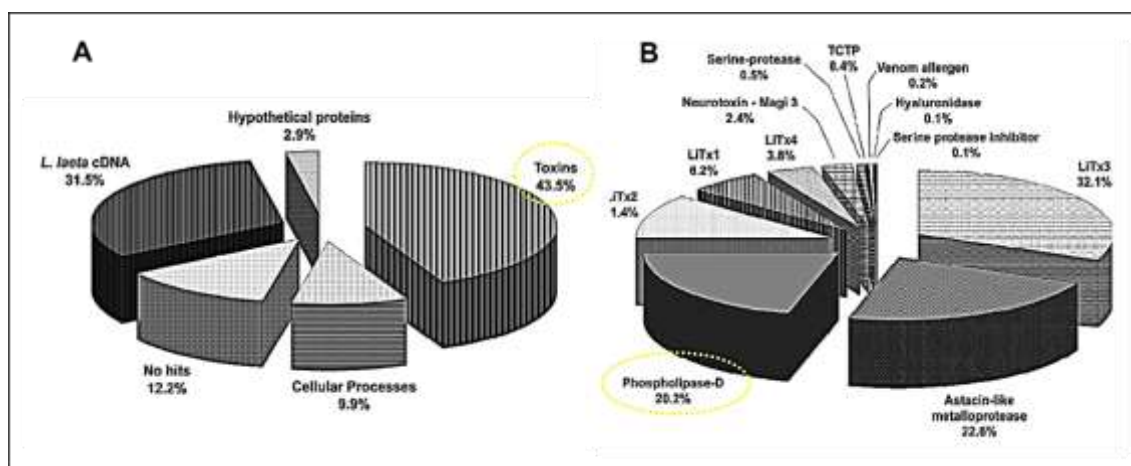


FIGURA 4- TRANSCRIPTOMA DE *Loxosceles intermedia*. (A) Porcentagem dos transcritos agrupados de acordo com suas classes, com destaque para as toxinas (B) Proporções relativas de cada grupo de toxinas em relação ao total de transcritos codificadores de toxinas, com destaque para as fosfolipases-D. Adaptado de: GREMSKI *et al.*, (2010).

De todas as toxinas descritas para o veneno loxoscélico, as fosfolipases-D são as que se encontram melhor caracterizadas e com sua atividade biológica melhor esclarecida (ANDRADE *et al.*, 2006; APPEL *et al.*, 2005; CHAIM *et al.*, 2011b). Estas proteínas possuem diversas regiões conservadas, apresentam resíduos de aminoácidos conservados no seu sítio catalítico, exibem um peptídeo-sinal seguido de um propeptídeo e possuem massa molecular em torno de 30 e 35 kDa (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007). As toxinas dermonecroticas são encontradas em venenos de muitas espécies de aranhas-marrons e foram primeiramente descritas como esfingomielinases-D. Tais toxinas estão intimamente relacionadas ao efeito de necrose observado no local da picada (da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; BARBARO *et al.*, 2005).

Outra família de toxinas identificadas em venenos loxoscélicos é a família das metaloproteases. Estas toxinas foram primeiramente descritas no

veneno de *L. intermedia* por Feitosa e colaboradores (1998), sendo caracterizadas como proteínas de baixa massa molecular com atividade fibronectinolítica, fibrinogenolítica (20-28 kDa) e gelatinolítica (32-35 kDa). Da Silveira e colaboradores (2007a) caracterizaram uma metaloprotease do veneno de *L. intermedia* como pertencente à família das astacinas, sendo esta a primeira descrição de enzimas dessa família em veneno animal. Recentemente, Trevisan e colaboradores (2010) identificaram duas novas isoformas de metaloproteases em *L. intermedia* pertencentes à mesma família denominadas de LALP2 e LALP3 (*Loxosceles Astacin-Like Protease*).

Além das fosfolipases-D e metaloproteases, outras toxinas descritas em venenos loxoscélicos são as hialuronidases, enzimas apontadas como possíveis potencializadoras da ação de outros componentes por provavelmente facilitar o seu espalhamento, uma vez que agem sobre a matriz extracelular (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Em *L. intermedia*, foram identificadas duas prováveis isoformas de hialuronidases com massas de 41 e 43 kDa (da SILVEIRA *et al.*, 2007b). Essas enzimas são hidrolases do tipo endo- β -N-acetil-D-hexosaminidase, que geram resíduo terminal N-acetilglucosamina após a clivagem do ácido hialurônico. Sua provável contribuição no quadro dermonecrótico consiste na extensão das lesões dermonecróticas e no espalhamento gravitacional (da SILVA *et al.*, 2004; da SILVEIRA *et al.*, 2007b; GREMSKI, *et al.*, 2010; CHAIM *et al.*, 2011b).

2.5 FOSFOLIPASES-D

A ação do veneno loxoscélico pode ser melhor compreendida quando se observa a ação das fosfolipases-D, pois esta toxina quando estudada isoladamente, é capaz de reproduzir quase todos os efeitos observados no loxoscelismo. Inicialmente, esta toxina foi denominada esfingomielinase-D (SMase-D), mas como esta enzima é capaz de hidrolisar um amplo espectro de fosfolípídeos, este termo já não é mais apropriado para descrevê-la (LEE e LYNCH, 2005; CHAIM *et al.*, 2011b). A mobilidade eletroforética das fosfolipases-D analisadas em gel bidimensional é de 30 a 35 kDa. Já foram

caracterizadas várias isoformas desta toxina nos venenos loxoscélicos, as quais apresentam um alto nível de identidade e têm sido chamadas de família Loxtox (*Loxosceles toxin*) por alguns autores (KALAPOTHAKIS, 2007). Outra denominação encontrada na literatura para as fosfolipases-D é de fator/proteína dermonecrótica, devido sua principal atividade biológica de induzir a dermonecrose (APPEL *et al.*, 2005). A partir de estudos filogenéticos, evolutivos e moleculares da família dos genes que codificam para as fosfolipases-D da família *Sicariidae*, Binford e colaboradores (2009) propuseram uma nova nomenclatura, que seria a denominação desta família de genes de *SicTox* (*Sicariidae Toxin*).

Em *L. reclusa*, esta família de enzimas apresenta massa molecular de aproximadamente 32 kDa, e produz isoladamente a dermonecrose em experimentos com animais. Já foram descritas 4 isoformas ativas para esta espécie, que causam lesões necróticas, hemólise e agregação plaquetária (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004). Machado e colaboradores (2005) a partir da análise proteômica do veneno de *L. gaucho*, identificaram 8 isoformas da família das fosfolipases-D, as quais foram denominadas de Loxonecroginas. Foram também descritas duas isoformas de fosfolipases-D no veneno de *L. laeta*, denominadas SMase I (32 kDa) e SMase II (35 kDa), que experimentalmente possuem atividade esfingomielinásica, dermonecrótica e hemolítica (TAMBOURGI *et al.*, 2000; FERRARA *et al.*, 2009; MURAKAMI *et al.*, 2005). Recentemente, Catalán e colaboradores (2011) descreveram duas novas isoformas em *L. laeta*, as quais foram chamadas de rLIPLD1 e rLIPLD2, e demonstraram que a primeira possui atividade esfingomielinásica e hemolítica, e a segunda parece ser inativa.

Quanto à atividade enzimática, as fosfolipases-D loxoscélicas realizam a hidrólise da esfingomielina, com a formação da ceramida-1-fosfato (C1P) e colina, subprodutos envolvidos em importantes fenômenos biológicos (MARCHESINI e HANNUN, 2004). Lee e Lynch (2005) mostram que uma fosfolipase-D de 34 kDa, clonada a partir da glândula produtora de veneno de *L. reclusa*, foi capaz de hidrolisar não somente a esfingomielina, mas também outros fosfolipídeos, como por exemplo, lisofosfolipídeos, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilglicerol, ácido lisofosfatídico e ácido fosfatídico cíclico.

Recentemente, Chaim e colaboradores (2011b), observaram a atividade fosfolipásica da isoforma recombinante de fosfolipase-D de *L. intermedia*, mostrando que esta possui especificidade por diferentes substratos. Esta foi capaz de hidrolisar uma variedade de fosfolipídeos como, esfingolipídeos e fosfatidilglicerídeos, em especial esfingomielina e lisofosfatidilcolina, estes muito relacionadas com a sinalização celular, e em menor intensidade fosfatidilcolina, o fosfolipídeo mais abundante nas membranas celulares.

As fosfolipases-D podem ser agrupadas em duas classes, baseado na sua sequência aminoacídica, na sua estrutura e na sua atividade catalítica. As fosfolipases-D da classe I, que são representadas pela PLD I de *Loxosceles laeta*, são caracterizadas pela presença de uma única ponte dissulfeto (Cys51 e Cys57) e um extenso *loop* flexível. As fosfolipases-D da classe II contém duas pontes dissulfeto que liga o *loop* flexível e o *loop* catalítico. Dependendo da sua capacidade de hidrolisar esfingomielina, são divididas em subclasses IIa (mais ativos) e subclasse IIb (menos ativos / inativos) (MURAKAMI *et al.*, 2006; GIUSEPPE *et al.*, 2011).

Murakami e colaboradores (2006) reportaram estudos estruturais através da cristalografia e por difração de raios-X de uma isoforma de fosfolipase-D presente no veneno de *L. laeta*. Esta enzima possui a forma distorcida de um barril (α/β)₈, formada por folhas- β e α -hélices conectadas por 3 *loops* denominados de *loop* flexível, *loop* hidrofóbico e *loop* catalítico (Figura 5A). O *loop* catalítico (resíduos 46-60) contém os resíduos de His12 e His47, que são conservados entre as SMases-D de aranhas e bactérias, e que juntamente com o íon Mg^{+2} formam o sítio catalítico capaz de hidrolisar esfingomielina (Figura 5B).

Neste mesmo estudo, os autores sugerem um mecanismo catalítico para esta enzima (Figura 5C). Nele, a His47 inicia o processo da hidrólise, comportando-se como um nucleófilo que ataca a ligação fosfodiéster do substrato, gerando uma estrutura penta-coordenada. Já a His12 doa um próton (H^+) para esta estrutura penta-coordenada gerando a colina. A His12 retira um átomo de H^+ da molécula de água, iniciando um segundo ataque nucleófilo sobre o intermediário da reação, que dessa vez, resulta na formação e liberação da ceramida-1- fosfato (C1P).

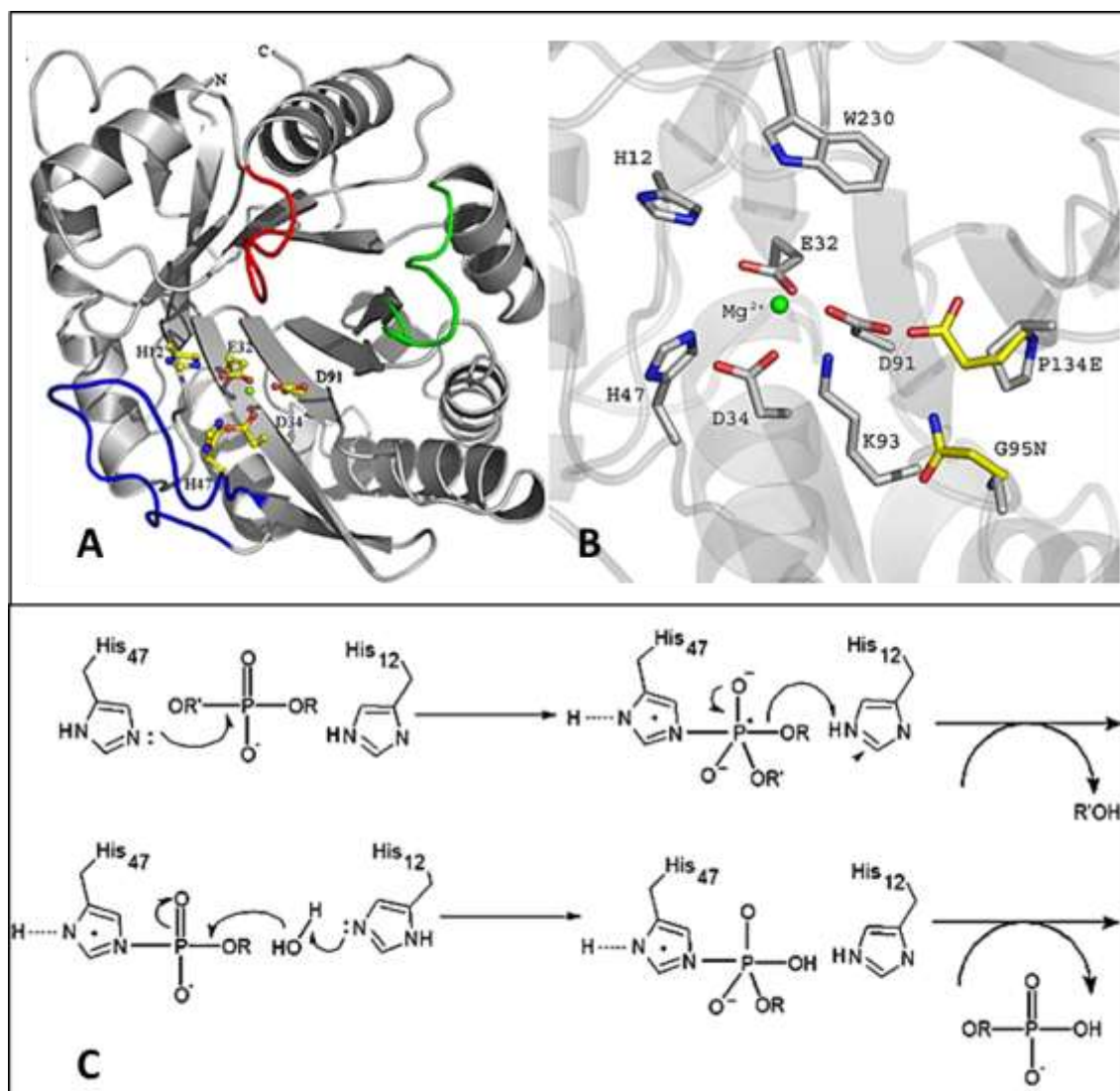


FIGURA 5- REPRESENTAÇÃO EM FITA E MECANISMO CATALÍTICO DA SMase I DE *Loxosceles laeta*. (A) Loop catalítico (azul), loop flexível (vermelho) e loop variável (verde). (B) Vista do sítio catalítico, mostrando os resíduos de aminoácidos de His12 e His47 e o íon Mg²⁺. (C) A atividade fosfolipásica do tipo D é uma hidrólise dependente de ataques nucleófilos das histidinas sobre a ligação fosfodiéster do substrato. Adaptado de: MURAKAMI *et al.* (2006).

Recentemente, Giuseppe e colaboradores (2011) descreveram a estrutura tridimensional de uma fosfolipase-D recombinante pertencente à classe II (subclasse IIa) de *Loxosceles intermedia*, denominada LiRecDT1. Esta toxina também possui forma de TIM barril (α - β)₈ e possui os loops catalítico, flexível e variável. Fazendo uma análise comparativa entre a isoforma PLD1 de

L. laeta (Classe I) e a LiRecDT1 de *L. intermedia* (Classe II), os autores mostram que além da ponte dissulfeto nos aminoácidos Cys51 e Cys57, a LiRecDT1 possui uma ponte dissulfeto adicional nos aminoácidos Cys53 e Cys201, ligando o *loop* flexível ao *loop* catalítico (Figura 6A). Esta ponte adicional favorece o deslocamento do *loop* flexível em direção ao *loop* catalítico, ocluindo a fenda eletrostática e diminuindo a cavidade do sítio catalítico (Figura 6B e C). Este trabalho sugere que essas diferenças eletrostáticas no sítio catalítico entre as duas classes de fosfolipases-D resultam em diferentes maneiras de orientar o substrato na fenda catalítica que também podem desencadear diferentes afinidades pelo substrato.

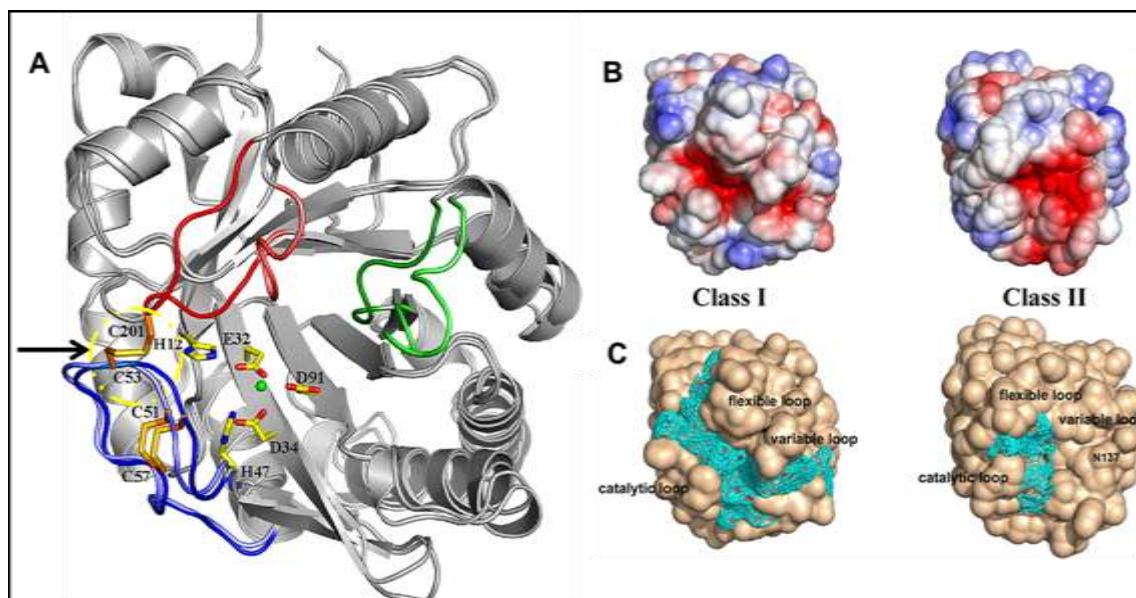


FIGURA 6- ALINHAMENTO ESTRUTURAL DE LiRecDT1 E PLD DE *Loxosceles laeta* E AVALIAÇÃO DA ACESSIBILIDADE DE SOLVENTE NA SUPERFÍCIE DE PLD DAS CLASSES I E II. (A) Sobreposição de LiRecDT1 e PLD de *L. laeta* mostrando os resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação do íon Mg^{+2} (esfera verde). Os *loops* catalítico, flexível e variável estão representados em azul, vermelho e verde, respectivamente. As pontes dissulfeto estão representadas em laranja; a seta indica a ponte dissulfeto adicional presente em PLD da classe II (Cys 53 e 201). (B) Análise da superfície de PLD das classe I e II superfície eletrostática da classe I (à esquerda) e classe II (à direita) de PLDs são coloridas pela carga, vermelho (-2 kV) e azul (+2 kV). Potencial eletrostático foi calculado usando solvente PBEQ. (C) Representação das estruturas e cavidades (ciano) na respectiva classe I e II do PLD. Adaptado de: Giuseppe *et al.* (2011).

Com o advento das técnicas de biologia molecular e análise proteômica, confirmou-se a presença de um grupo de proteínas homólogas pertencente a

uma grande família de toxinas dermonecróticas nos diferentes venenos loxoscélicos (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008; CHAIM *et al.*, 2011a). Várias toxinas dermonecróticas têm sido descritas pela clonagem e expressão de proteínas recombinantes nos venenos de *L. laeta* (FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2002; FERNANDES-PEDROSA *et al.*, 2008; FERRARA *et al.*, 2009), *L. intermedia* (APPEL, *et al.*, 2008; CHAIM, *et al.*, 2006; da SILVEIRA, *et al.*, 2006a; 2006b; TAMBOURGI *et al.*, 2004; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2002; GREMSKI *et al.*, 2010), *L. boneti* e *L. reclusa* (RAMOS-CERILLO *et al.*, 2004) e pela análise proteômica do veneno total de *L. gaucho* que descreveu pelo menos 8 isoformas de toxina dermonecrótica (MACHADO *et al.*, 2005).

Nosso grupo já identificou, clonou e caracterizou 6 isoformas recombinantes de fosfolipases-D presentes no veneno de *L. intermedia*. Estas toxinas foram clonadas a partir de uma biblioteca de cDNA da glândula produtora de veneno e identificadas a partir do sequenciamento aleatório dos clones obtidos por esta biblioteca. Estas isoformas foram expressas em cepa bacteriana de expressão *E. coli* BL21(DE3)pLysS para a caracterização bioquímica e avaliação biológica. Desta maneira foram caracterizadas as isoformas de fosfolipases-D recombinantes, chamadas de *Loxosceles intermedia* recombinante dermonecrotic toxins LiRecDT1 (CHAIM *et al.*, 2006), LiRecDT2 e LiRecDT3 (da SILVEIRA *et al.*, 2006a), LiRecDT4 e LiRecDT5 (da SILVEIRA *et al.*, 2006b) e LiRecDT6 (APPEL *et al.*, 2008).

No quadro clínico do loxoscelismo, as fosfolipases-D possuem papel fundamental ao desencadear os principais sintomas, como: dermonecrose, hemólise, agregação plaquetária, distúrbios renais, citotoxicidade, nefrotoxicidade, alterações na permeabilidade vascular, coagulação intravascular disseminada, edema e massiva resposta inflamatória (FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; SWANSON e VETTER, 2006; TAMBOURGUI *et al.*, 2010). Na literatura, encontram-se estudos envolvendo as isoformas recombinantes da família das fosfolipases-D de *L. intermedia*, mostrando que estas enzimas isoladamente reproduzem efeitos biológicos muito semelhantes com o veneno nativo. Na tabela 4, estão descritos os principais efeitos biológicos das fosfolipases-D recombinantes de *L. intermedia*.

TABELA 4- COMPARAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DAS FOSFOLIPASES-D RECOMBINANTES DE *Loxosceles intermedia*

<i>Loxosceles intermedia</i> Recombinant Dermonecrotic Toxins (LiRecDT)	Atividade Biológica
LiRecDT1 (DQ 218155) Chaim <i>et al.</i> , (2006); Ribeiro <i>et al.</i> , (2007); Kalapothakis <i>et al.</i> , (2007)	↑atividade esfingomielinásica; ↑dermonecrose; ↑resposta inflamatória; ↑citotoxicidade; ↑hemólise; ↑agregação plaquetária; ↑permeabilidade vascular; ↑edema; ↑mortalidade em camundongos.
LiRecDT2 (DQ266399) da Silveira <i>et al.</i> , (2006a); Ribeiro <i>et al.</i> , (2007); Kalapothakis <i>et al.</i> , (2007)	↑atividade esfingomielinásica; ↑dermonecrose; ↑resposta inflamatória; ↑citotoxicidade; ↑hemólise; ↑agregação plaquetária; ↑permeabilidade vascular; ↑edema ↑mortalidade em camundongos.
LiRecDT3 (DQ218155) da SILVEIRA <i>et al.</i> , 2006a; RIBEIRO <i>et al.</i> , 2007; KALAPOTHAKIS <i>et al.</i> , 2007	↓atividade esfingomielinásica; †dermonecrose; ↑resposta inflamatória; ↓citotoxicidade; ↓hemólise; ↓agregação plaquetária; ↓permeabilidade vascular; ↓edema †mortalidade em camundongos.
LiRecDT4 (DQ431848) da Silveira <i>et al.</i> , (2006b); Kalapothakis <i>et al.</i> , (2007)	↑atividade esfingomielinásica; ↓dermonecrose; ↓resposta inflamatória; ↓agregação plaquetária; ↓permeabilidade vascular †mortalidade em camundongos.
LiRecDT5 (DQ431849) da Silveira <i>et al.</i> , (2006b); Kalapothakis <i>et al.</i> , (2007)	↓atividade esfingomielinásica; ↓dermonecrose; ↓resposta inflamatória; ↓agregação plaquetária; ↓permeabilidade vascular; †mortalidade em camundongos.
LiRecDT6 (DQ267927) Appel <i>et al.</i> , (2008)	↑atividade esfingomielinásica; ↑dermonecrose; ↑resposta inflamatória; ↓agregação plaquetária; ↓permeabilidade vascular; ↓edema ↑mortalidade em camundongos.
LiD1 (AAQ16123) Kalapothakis <i>et al.</i> , (2002); Kalapothakis <i>et al.</i> , (2007)	↓atividade esfingomielinásica; ↑dermonecrose; ↑agregação plaquetária; ↓hemólise.

↑= alta atividade; ↓= média atividade; ↓= baixa atividade; †=ausência de atividade.

Recentemente, ensaios com uma forma mutada da LiRecDT1 (LiRecDT1 H12A), na qual foi realizada uma mutação sítio dirigida no aminoácido que faz parte do sítio catalítico H12→A12, demonstraram que esta possui uma diminuição na atividade catalítica, reduzindo consideravelmente a

atividade dermonecrótica, hemolítica e baixa resposta inflamatória (KUSMA *et al.*, 2008, CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2009; CHAIM *et al.*, 2011a).

Kalapothakis e colaboradores (2007) organizaram as fosfolipases-D de *L. intermedia* até então clonadas e caracterizadas em seis grupos. Cada grupo contendo toxinas dermonecróticas com sequência aminoacídica, características bioquímicas e atividades biológicas análogas. As toxinas LiRecDT1, DT2, DT3, DT4 e DT5 foram incluídas em cinco dos seis grupos descritos e a toxina LoxTox i5 (EF535254.1) no sexto grupo. A LiRecDT6 foi descrita posteriormente (APPEL *et al.*, 2008) e, de acordo com os parâmetros estipulados para categorização, não pode ser incluída em nenhum dos seis grupos.

Como descrito anteriormente, Gremski e colaboradores (2010), produziram o transcriptoma da glândula produtora de veneno de *L. intermedia*. Este estudo revelou que 43,5% das EST's ("Expression Sequences Tags") anotados eram codificadoras para toxinas em geral. Entre estas sequências, verificou-se que grande parte, ou seja, 20,2% dos EST's codificavam para mRNA's de fosfolipases-D.

Os resultados desse trabalho confirmam a presença de várias isoformas de fosfolipases-D (Tabela 5). Foram identificados transcritos de todos os grupos Loxtox (grupo 1 ao 6) propostos por Kalapothakis *et al.* (2007). Também foi identificada a isoforma LiRecDT6 descrita por Appel *et al.* (2008). Além destas isoformas que são conhecidas na literatura, foram identificados neste trabalho 5 *clusters* similares a fosfolipases-D de *L. intermedia* cujas sequências não puderam ser incluídas em nenhum dos grupos *LoxTox* e que também não puderam ser classificadas como LiRecDT6. Entre eles, o *contig* LIC423 e o *singleton* LIS9 representaram 10,5% entre os transcritos das fosfolipases-D (destaque na Figura 7), e puderam ser considerados transcritos codificantes para uma importante provável nova isoforma desta família de toxinas (GREMSKI *et al.*, 2010).

TABELA 5- REPRESENTAÇÃO DE EST's QUE CODIFICAM PARA A TOXINA DA FAMÍLIA DAS FOSFOLIPASES-D PRESENTE NO VENENO DE *Loxosceles intermedia*. Em destaque o cluster LIC423/LIS9. Adaptado de: GREMSKI *et al.*, (2010).

Phospholipase-like toxins	No. of clusters	No. of ESTs	% Over total phospholipases
Loxtox group 1 ^a	4	23	14.2
Loxtox group 2 ^a	2	67	41.3
Loxtox group 3 ^a	2	9	5.6
Loxtox group 4 ^a	1	5	3.1
Loxtox group 5 ^a	1	4	2.5
Loxtox group 6 ^a	4	23	14.2
LiRecDT6 ^b	3	5	3.1
LIC423/LIS9	2	17	10.5
LIC316	1	3	1.8
LIC203	1	2	1.2
LIS80	1	1	0.6
LIS279	1	1	0.6

O estudo do veneno total é bastante relevante, já que permite uma visão geral e caracterização do envenenamento, além de permitir a identificação de novas atividades bioquímicas e farmacológicas. No entanto, um estudo mais refinado das características e funções das toxinas isoladamente é, sem dúvida, essencial para conhecer de maneira profunda a atividade de qualquer veneno. Estes estudos, por sua vez, pressupõem o isolamento de toxinas.

Com base nesses conhecimentos e com a ajuda de técnicas de biologia molecular, o objetivo deste trabalho foi a caracterização, clonagem, expressão e análise das atividades biológicas desta nova isoforma de fosfolipase-D presente no veneno de *L. intermedia*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir uma nova toxina recombinante da família das fosfolipases-D de *Loxosceles intermedia*. Avaliar suas características biológicas e bioquímicas, buscando correlação com o quadro do envenenamento e explorar o seu potencial biotecnológico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar uma nova isoforma de fosfolipase-D do veneno de *Loxosceles intermedia* analisando sua sequência primária.
- Obtenção da toxina clonada em vetor de expressão plasmidial para a expressão heteróloga em modelo bacteriano da toxina recombinante.
- Obtenção da proteína recombinante purificada para avaliar as propriedades bioquímicas e biológicas da nova toxina através de experimentos de ensaio biológico “*in vivo*” e “*in vitro*”, contribuindo para a compreensão da atividade biológica e seu mecanismo celular e molecular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para extração do veneno, foram utilizadas aranhas adultas da espécie *Loxosceles intermedia* coletadas em Curitiba e Região Metropolitana (Paraná) e mantidas em condições apropriadas no Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos da Universidade Federal do Paraná. A utilização de animais para finalidade científica, foi aprovada pelo Sistema de Autorização em Informação da Biodiversidade (SISBIO), sendo o número do documento da autorização: **29801-1**.

4.2 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DA GLÂNDULA PRODUTORA DE VENENO DE *L. intermedia*

As técnicas de biologia molecular realizadas no presente trabalho tiveram além de artigos como referência, os métodos propostos pelos manuais dos kits e por protocolos adaptados a partir de Sambrook & Russel (2001).

O método utilizado foi adaptado a partir de Chomezynski (1993). Foi extraído o RNA total de 100 glândulas de espécimes de *L. intermedia* (5 dias após a coleta do veneno) com auxílio do reagente Trizol® e todo o material e demais reagentes livres de RNases. Utilizando isopropanol, o RNA foi precipitado, sendo posteriormente lavado com isopropanol 75% e redissolvido com DEPC tratada (água ultrapura homogeneizada com 0,1% DEPC por 2 horas e esterilizada pelo método de autoclavação por 45 minutos).

4.3 QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO RNA TOTAL EXTRAÍDO

Para saber a concentração do RNA extraído e a razão de ácido nucléico em relação às proteínas foi realizada a dosagem em Nanodrop1000® (*ThermoScientific*), com a utilização de 1 µL do RNA total extraído.

Para saber a integridade do RNA extraído, foi realizada eletroforese em gel agarose 1% com brometo de etídio (0,5 µg/ml) em tampão TAE (Tris base 40 mM/ Acetato 20 mM/ EDTA 1mM) e corrida eletroforética em cuba horizontal a 5 V/cm de gel. O gel foi visualizado e a imagem foi registrada com auxílio de aparelho de análise de imagens *Chemidoc – XRS* e software *Quantity One – SW* (*BioRad*).

4.4 TRANSCRIÇÃO REVERSA ACOPLADA À REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA

A técnica utilizada foi adaptada a partir de Sambrook & Russel (2001). Com o objetivo de obter a porção 5' de um cDNA específico, do qual já se conhece parte da sequência (*contig* 423), em um tubo para PCR de 0,2 µL, foi adicionado um volume equivalente a 1 µg de RNA total; 0,2 µM de oligonucleotídeo gene-específico *antisense* e água DEPC tratada q.s.p. 10µL. Este tubo foi incubado a 70°C por 5 minutos, em termociclador (*My Cycler – Thermal Cycler BioRad, Hercules, CA, EUA*) para a desnaturação do RNA e, imediatamente, colocado em gelo. Após esta etapa, foram adicionados tampão para Transcriptase Reversa (1x), MgCl₂ (2,5 mM), dNTPs (0,4 mM), inibidor de RNase (20 U) e água DEPC tratada suficiente para 10 µL. Após homogenização com auxílio de micropipeta, foram acrescentadas 200 U da enzima Transcriptase Reversa e a mistura foi incubada novamente no termociclador a 25°C por 5 minutos e 42°C por 60 minutos. A reação foi parada a 70°C por 15 minutos, sendo mantida a 4°C até a próxima etapa.

O cDNA obtido foi seletivamente precipitado com acetato de amônio (2,5 M) e etanol absoluto gelado (3 v: 1 v de amostra). A mistura foi incubada a

20°C por 30 minutos. Logo, procedeu-se centrifugação a 4°C, 20.000x g, por 30 minutos. Após retirado o sobrenadante, o pellet foi lavado com 750 µL de etanol 70% gelado e centrifugado a 4°C, 20.000x g, por 5 minutos. Seguiu-se a retirada do sobrenadante e, por fim, o pellet foi ressuspenso em 12 µL de água ultrapura. A essa solução foram adicionados tampão para a enzima Terminal desoxinucleotidil Tranferase (TdT) (1x) e dATP (0,2 mM). A reação foi incubada a 94°C por 2 minutos, colocada imediatamente em gelo, seguida de adição de 20 U da enzima TdT e incubação a 37°C por 10 minutos. A enzima foi inativada a 65°C por 10 minutos. No final desta etapa obteve-se a primeira fita de cDNA com uma cauda homopolimérica de adenina na extremidade 3'. A partir deste produto, uma reação de PCR foi realizada para gerar a segunda fita do cDNA. Para esta reação utilizou-se tampão para *Taq* DNA polimerase (1 vez), MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM), oligonucleotídeo gene-específico *antisense* (0,4 µM), *(dT)17Adaptor-primer* (oligonucleotídeo adaptador para cauda homopolimérica – 0,4 µM), cDNA (5 µL), *Taq* DNA polimerase (1,25 U/ 50 µL), para um volume final de reação de 50 µL. Esta mistura foi incubada em termociclador conforme o protocolo a seguir: 1 ciclo a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos a 94°C por 30 segundos - 50°C por 30 segundos – 72 °C por 1 minuto; 1 ciclo 72°C por 10 minutos; 1 ciclo de espera a 4°C, infinito (ciclo de espera).

4.5 EXTRAÇÃO DOS FRAGMENTOS DO GEL DE AGAROSE

Para a análise do produto de PCR, foi realizada eletroforese em gel agarose 1,5% com brometo de etídio (0,5 µg/mL) em tampão TAE (Tris base 40 mM/ Acetato 20 mM/ EDTA 1 mM) e corrida eletroforética em cuba horizontal a 5 V/cm de gel. O gel foi visualizado e a imagem foi registrada com auxílio de aparelho de análise de imagens *Chemidoc – XRS* e software *Quantity One – SW* (BioRad).

O gel de agarose foi recortado com auxílio de bisturi no local de visualização das bandas correspondentes aos fragmentos específicos. Colocado em eppendorfs e extraídas com auxílio de reagentes apropriados para extração de DNA em gel (*Gel Band Purification kit*, GE®).

4.6 REAÇÃO DE ADENILAÇÃO DO INSERTO

O DNA amplificado e gel-extraído foi submetido a reação de adenilação nas seguintes condições: Tampão *Taq* polimerase (10 vezes), $MgCl_2$ (1,5 mM), dATP (0,2 mM), *Taq DNA* polimerase (1,25 U/ 50 μ L), para um volume final de reação de 10 μ L. Esta mistura foi incubada em termociclador à 70°C por 25 minutos.

4.7 LIGAÇÃO EM PGEM-T

O DNA amplificado foi diluído em água, dosado e o volume correspondente a 0,075 pmol deste inserto foi colocado em microtubo *PCR*. Posteriormente foi adicionado 50ng do vetor pGEM-T (vetor A-T), tampão ligase (1 vez) e T4 DNA ligase (3 U/ μ L). Esta reação foi incubada a 16°C por 16 horas. Após esse período de ligação, o DNA foi precipitado com acetato de sódio 3 M, pH 6,0 e etanol absoluto (0,1 v : 3 v de amostra) de modo semelhante à precipitação do cDNA.

4.8 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

Uma alíquota de solução de bactéria DH5 α eletrocompetente foi descongelada e mantida em gelo adicionando 1 μ L da reação de ligação e eletroporando-a sob condições de 1.8 kV, 25 MF, 200% em eletroporador *Gene PulserX-Cell® BioRad*.

Estas bactérias foram colocadas em meio SOC (triptona 20 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 0,5 g/L; KCl 2,5 mM; $MgCl_2$ 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, glicose 0,2 M) a 37°C por 1 hora sobre agitação para expressar o gene que confere resistência ao antibiótico específico e recuperarem suas membranas da alta voltagem.

4.9 PLAQUEAMENTO DAS BACTÉRIAS TRANSFORMADAS

As bactérias recuperadas foram divididas em duas porções: uma de 100 µL plaqueadas em meio LB ágar (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, cloreto de sódio 10 g/L, agar-ágar 15 g/L) suplementado com ampicilina (100 µg/mL) previamente tratada com IPTG (100 mM - 100µL) e X-GAL (20mg/mL – 40 µL); e outra de 900 µl que foi submetida a centrifugação e ressuspensão em 100 µL de meio SOC para o plaqueamento. As placas com a suspensão bacteriana foram espalhadas com alça de *Drigalski* de vidro estéril até completa secagem do líquido. As placas foram incubadas a 37°C (em incubadora tipo BOD 411 D, Nova Ética) por 16 horas.

4.10 PCR DE COLÔNIA

Após observação das placas anteriormente citadas, foram escolhidas colônias incolores (supostamente com inserto), algumas azuis e outras parcialmente azuis para replaqueamento (*Master plate*) e confecção do PCR de colônia. Cada uma das colônias escolhidas foi tocada com auxílio de palito de madeira estéril, parte do material adicionado no fundo de um tubo de 0,2 mL e outra parte tocada na *Master plate* quadriculada e numerada. Nos tubos foram acrescentados: Tampão *Taq* DNA polimerase (1 vez); dNTPs (0,2mM); MgCl₂ (1,5 mM); oligonucleotídeo sense universal T7 (0,2 µM); oligonucleotídeo universal *antisense* SP6 (0,2 µM) e *Taq* polimerase (1,25 U/50µL). Esta mistura foi incubada em termociclador, para amplificação do inserto no seguinte protocolo: 95°C/ 5 minutos (1ciclo); 95°C/ 30 segundos – temperatura média das *TMs* dos primers diminuídos de 5°C/ 30 segundos – 72°C/ 1 minuto (35 ciclos); 72°C/ 10min (1ciclo); 4°C/ infinito. O produto do PCR de colônia foi analisado em gel de agarose 1,5%. O resultado foi visualizado e registrado em aparelho de captura de imagem Chemidoc.

4.11 MINIPREPARAÇÃO PLASMIDIAL

A partir da *Master plate* os clones escolhidos foram repicados com auxílio de pinça e palitos de madeira estéreis para um pré-inóculo em LB líquido com ampicilina (100 µg/mL) e incubado por 16 horas a 37°C (em incubadora 430 RDB tipo *shaker* Nova Ética) em tubo de polipropileno de aeração. Cada cultura com crescimento saturado foi centrifugada (14000x g por 1 minuto) a temperatura ambiente e se obteve um sedimento bacteriano consistente. De cada um dos centrifugados bacterianos foi feita a extração do plasmídeo com auxílio de reagentes de Miniprep da Promega (*WizardPlus SV Minipreps DNA Purification Systems*®).

4.12 REAÇÃO E ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO

Foi utilizado o protocolo de sequenciamento *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems), com um volume total de reação de 10 µL. Destes 3 µL era o reagente *Big Dye* e os outros 7 µL eram a somatória do volume de DNA molde, oligonucleotídeo e água estéril. A massa de plasmídeo utilizada dependia do tamanho do inserto, segundo *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*. Cada clone foi submetido à duas reações de seqüenciamento, uma utilizando o iniciador universal *sense T7* e outra o iniciador universal *antisense SP6*. Essas reações foram levadas em termociclador de placa à 95°C / 20 minutos - 50°C / 15 segundos - 60°C / 4 minutos (35 ciclos); 4°C / infinito.

Para a precipitação do produto a ser sequenciado, adicionou-se acetato de sódio/ EDTA (1,5 M / 0,25 M) (1/10 do volume inicial da reação) em seguida etanol absoluto gelado (3 vezes o volume da reação), homogeneizou-se bem e incubou-se em gelo por 10 minutos. Seguiu-se centrifugação 4 °C por 20 minutos, 20.000x g. Retirando-se o sobrenadante e lavando o sedimento com etanol 70% gelado (500 µL), passando o líquido pelo sedimento sem homogeneizar, centrifugou-se por 10 minutos 20.000x g a 4 °C. Desprezou-se completamente o sobrenadante e secou-se o sedimento em temperatura

ambiente dentro do fluxo laminar por 15 minutos, retirando-se completamente o etanol que pode interferir no sequenciamento. Finalmente, o produto foi ressuspensionado em formamida.

O sequenciamento foi realizado em sequenciador por eletroforese capilar 3500 xL *Genetic Analysers* (Applied Biosystems® 3500) e os resultados analisados em *software ChromasPro version 1.5*. O alinhamento e análise das seqüências adquiridas foi realizado através do *Clustalw* <<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>>; a seqüência mais representativa escolhida foi analisada em frente ao banco de dados disponível usando a ferramenta *nucleotide blast BLAST* <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>.

4.13 PCR COM *Pfu* DNA POLIMERASE

Com base nos resultados dos sequenciamentos e da obtenção da seqüência de cDNA completa que codifica a toxina, foi desenhado um oligonucleotídeo iniciador *sense* para a amplificação do cDNA específico da toxina pela enzima *Pfu* DNA polimerase. Primeiramente foi realizada uma reação de transcrição reversa com oligo (dT)₁₇ *adaptor* nas condições já descritas em 4.4. Com a obtenção do cDNA, utilizou-se o oligonucleotídeo específico para a extremidade (5' GCTTTAATATTTGGCTGCTGGCG 3') e para a extremidade 3' utilizou-se o oligo (dT)₁₇ na concentração de 0,2 µM e a enzima *Pfu* DNA polimerase (1,25 U/ 50 µL). A reação foi realizada em termiclador nas seguintes condições: 95°C / 2 minutos; 95°C / 30 segundos; 59,5°C / 30 segundos; 72°C / 3 minutos (40 ciclos); 72°C / 3 minutos; 4°C / infinito. O volume total da reação foi de 50 µL.

As etapas de ligação, transformação, *miniprep*, sequenciamento e análise de seqüenciamentos foram realizados do mesmo modo que descrito anteriormente.

4.14 SUBCLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO pET-14b

O plasmídeo escolhido para subclonar a sequência madura e para a expressão da toxina LiRecDT7 foi o pET-14b (Novagen). Primeiramente, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores com sequência de reconhecimento para as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* para a subclonagem direcional. Os oligonucleotídeos foram desenhados de acordo com informações contidas em Sambroock & Russel (2001).

Foi escolhido um dos clones sequenciados que com a sequência de completa da proteína para fazer uma extração plasmidial. Utilizando desta *miniprep* e os iniciadores desenhados com sítios de restrição, fez-se uma *PCR* em termociclador com *Pfu* DNA polimerase, com temperatura de anelamento ideal de 58°C.

O produto desta *PCR* foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose 1,5 % e extraída com auxílio de kit de extração. Posteriormente, foi realizada a digestão do inserto e do vetor nas seguintes condições: 7U de cada enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, Tampão Tango 2 vezes, 1 µg de inserto e 3 µg de vetor à 37°C por 16 horas. Ambos foram purificados através da extração em gel e submetidos à ligação em uma proporção de 3 : 1 com Tampão Ligase (1vez) e T4 DNA ligase (5 U / µL) em termociclador à 16°C por 16 horas.

O produto dessa ligação, o qual denominamos de construção inserto/vetor, foi transformada por eletroporação em cepa bacteriana DH5α e posteriormente submetidos a *PCR* de colônia para verificação da presença de clones positivos. O clone positivo foi submetido a extração plasmidial e submetido à sequenciamento (protocolos já descritos acima).

4.15 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DA PROTEÍNA MADURA

A sequência nucleotídica obtida foi traduzida e analisada no programa *ProtParam* (disponível no site: <<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>>) para predição de peso molecular e ponto isoelétrico da proteína.

O alinhamento com sequências proteicas de outras isoformas de fosfolipases-D de *Loxosceles intermedia* e também com fosfolipases-D de outras espécies de aranhas-marrons foi realizada no programa Clustalw <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>. As sequências estão disponíveis em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein> (DQ 218155, DQ266399, DQ218155, DQ431848, DQ431849 e DQ267927).

4.16 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE LiRecDT7 EM *E. coli* BL21(DE3)pLysS

A preparação plasmidial do clone em fase de leitura confirmada pelo sequenciamento foi transformada em cepa bacteriana de expressão *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS quimiocompetente e as bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar contendo os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL).

Primeiramente, foi realizado um teste piloto de miniexpressão, para determinar as condições ótimas de concentração de indutor (IPTG isopropil-tio-2-D-galactopiranosideo) e tempo de expressão. O protocolo foi realizado segundo Sambrook & Russel (2001), com algumas adaptações.

Uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido contendo os antibióticos citados acima à 37°C durante 16 horas. Posteriormente, esta cultura foi inoculada em diluição 1:100 em 50 mL de meio LB líquido acrescido dos antibióticos. O crescimento foi monitorado pela determinação da densidade óptica (D.O) em 550 nm. Quando as culturas atingiram a D.O. entre 0,4 - 0,6 foi adicionado o indutor IPTG em diferentes concentrações (0,025 mM; 0,05 mM; 0,1 mM) e alíquotas de 1 mL foram coletadas em diferentes tempos de expressão (0 horas; 1 hora, 2 horas, 3 horas e 4 horas). As amostras foram analisadas por eletroforese em gel *SDS-PAGE* 12,5% em condições redutoras (5% de β-mercaptoetanol).

As culturas foram centrifugadas a 9000 g por 7 minutos e ressuspensas em 8 mL de tampão de ligação (fosfato sódico 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 30 mM e lisozima 1 mg/mL). A suspensão bacteriana

foi congelada a -20 °C por 16 horas e lisadas por 6 ciclos de 30 segundos de sonicação, e também por lise mecânica através da “*French Press*”. O sobrenadante do lisado foi também analisado nas mesmas condições de *SDS-PAGE* 12,5% descritas acima.

Além da padronização da concentração de indutor e o tempo necessário para a expressão da proteína, foi realizado um teste que favorece a expressão da proteína recombinante solúvel por otimizar a aeração do meio. A condição testada foi: 200ml de cultura em um erlenmeyer de 1L à 20°C por 20 horas.

Após a padronização das condições de expressão, o próximo passo foi a expressão em larga escala. Uma colônia isolada foi inoculada em 12 mL de meio LB líquido contendo os antibióticos citados acima à 37°C durante 16 horas. Posteriormente, esta cultura foi inoculada em diluição 1:100 em 1L de meio LB líquido acrescido dos antibióticos. O crescimento foi monitorado pela determinação da densidade óptica (D.O) em 550 nm. Quando as culturas atingiram a D.O. entre 0,4 - 0,6 foi adicionado 0,05 mM do indutor IPTG e alíquotas de 1mL foram coletadas antes e após a indução para análise por eletroforese em gel *SDS-PAGE* 12,5% em condições redutoras (5% de β -mercaptoetanol).

A cultura foi centrifugada a 9000 g por 7 minutos e ressuspensas em 40mL de tampão de ligação (fosfato sódico 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 30 mM e lisozima 1 mg/mL). A suspensão bacteriana foi congelada a -20°C por 16 horas e lisadas por lise mecânica através da “*French Press*”. Uma alíquota de sobrenadante do lisado foi também analisada por gel *SDS-PAGE* 12,5% e o restante submetido ao processo de purificação por cromatografia de afinidade em resina Ni⁺²-NTA agarose.

4.17 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE LiRecDT7 EM *E. coli* Shuffle

A mesma preparação plasmidial utilizada para a transformação em BL21(DE3)pLysS, também foi utilizada para a transformação em cepa bacteriana de expressão *Escherichia coli* *Shuffle T7 Express LysY* (New

England Biolabs, U.K, Hitchin) quimiocompetente e foram plaqueadas em meio LB ágar contendo o antibiótico ampicilina (100 µg/mL).

Primeiramente, foi realizado um teste piloto de miniexpressão, para determinar as condições ótimas de concentração de indutor (IPTG isopropil-thio-2-D-galactopiranoside) e tempo de expressão. O protocolo foi realizado segundo Sambrook & Russel (2001), com algumas adaptações.

Uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina à 30°C durante 16h. Posteriormente, esta cultura foi inoculada em diluição 1:100 em 50 mL de meio LB líquido acrescido do antibiótico. O crescimento foi monitorado pela determinação da densidade óptica (D.O) em 600 nm. Quando as culturas atingiram a D.O. 0,4 - 0,6 foi adicionado o indutor IPTG em diferentes concentrações (0,05 mM; 0,1 mM; 0,3 mM) e alíquotas de 1 mL foram coletadas em diferentes tempos de expressão (0 horas; 1 horas, 2 horas, 3 horas e 4 horas). As amostras foram analisadas por eletroforese em gel *SDS-PAGE* 12,5% em condições redutoras (5% de β-mercaptoetanol).

As culturas foram centrifugadas à 9000 g por 7 minutos e ressuspendidas em 8 mL de tampão de ligação (fosfato sódico 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 30 mM e lisozima 1 mg/mL). A suspensão bacteriana foi congelada a -20 °C por 16 horas e lisadas por 6 ciclos de 30 segundos de sonicação, e também por lise mecânica através da “*French Press*”. O sobrenadante do lisado foi também analisado nas mesmas condições de *SDS-PAGE* 12,5% descritas acima.

Após a padronização das condições de expressão, o próximo passo foi a expressão em larga escala. Uma colônia isolada foi inoculada em 12 mL de meio LB líquido contendo o antibiótico citado acima à 30°C durante 16 horas. Posteriormente, esta cultura foi inoculada em diluição 1:100 em 1L de meio LB líquido acrescido do antibiótico. O crescimento foi monitorado pela determinação da densidade óptica (D.O) em 600 nm. Quando as culturas atingiram a D.O. entre 0,4 - 0,6 foi adicionado 0,05 mM do indutor IPTG e alíquotas de 1mL foram coletadas antes e após a indução para análise por eletroforese em gel *SDS-PAGE* 12,5% em condições redutoras (5% de β-mercaptoetanol).

A cultura foi centrifugada a 9000 g por 7 minutos e ressuspensas em 40 mL de tampão de ligação (fosfato sódico 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 30mM e lisozima 1 mg/mL). A suspensão bacteriana foi congelada a -20 °C por 16 horas e lisadas por lise mecânica através da “*French Press*”. Uma alíquota de sobrenadante do lisado foi também analisada por gel SDS-PAGE 12,5% e o restante submetido ao processo de purificação por cromatografia de afinidade em resina Ni⁺²-NTA agarose.

4.18 PURIFICAÇÃO DA LiRecDT7

A purificação da LiRecDT7 expressa foi realizada por cromatografia de afinidade em resina Ni⁺²-NTA agarose. A suspensão de células em tampão de ligação foi descongelada e lisada com 6 ciclos de 30 segundos de sonicação a alta intensidade. Outro método de lise utilizado foi a lise mecânica através da “*French Press*”. O lisado foi centrifugado a 9000x g por 30 minutos e o sobrenadante incubado por 1 hora a 4°C com 1 mL de resina Ni⁺²-NTA agarose em agitação moderada. Procedeu-se lavagens em “*batch*” com tampão de lavagem (fosfato sódico 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 30 mM). A suspensão foi empacotada em coluna plástica e lavada exaustivamente com o tampão de lavagem, sendo a D.O. 280 nm monitorada durante todo o procedimento de purificação. A proteína foi eluída quando D.O. 280 nm atingiu 0,01, ou quando as leituras mostravam-se constantes, utilizando-se tampão de eluição (fosfato sódico 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 250 mM). O grau de pureza do eluato foi analisado por eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% sob condições redutoras.

4.19 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Eletroforeses foram realizadas em géis de poliacrilamida (12,5%) contendo detergente aniônico Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) em condições redutoras. Os géis foram preparados utilizando o aparato comercial

Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad, Hercules, EUA). A solução de poliacrilamida, contendo os catalisadores APS e TEMED, foi colocada entre placas de vidro e isolada com uma camada de isobutanol. Após a polimerização, foi removida a camada de água e isobutanol acima do gel com auxílio de papel filtro. A solução de empacotamento, contendo 5% de poliacrilamida e os catalisadores, foi colocada acima do gel e nela foi posicionado o pente para formação dos poços. Após a polimerização, o pente foi removido e os poços secos com auxílio de papel filtro. A separação das proteínas foi obtida mediante aplicação de corrente de 25 mA constante, até a separação total das proteínas. Os géis foram corados em solução contendo Azul de Coomassie Brilhante R-250 (Amresco, Ohio, EUA) 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10% em água deionizada, durante 10 minutos à temperatura ambiente sob agitação constante. A descoloração foi realizada com metanol 50% em água deionizada, com sucessivas trocas da solução de metanol (HARLOW e LANE, 1988).

4. 20 DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Azul de Coomassie, descrito por Bradford (1976), adaptado para leitura em leitor de placas de 96 wells (Meridian ELX 800). O método baseia-se na diferença de coloração em que o Azul de Coomassie pode se encontrar. Ao ligar-se a proteínas, o reativo passa da coloração vermelha para azul, sendo sua absorbância determinada em 595 nm. A curva padrão foi construída com diferentes quantidades (0,25 µg – 2,00 µg) de Soro Albumina Bovina e as amostras foram diluídas para entrarem na região de linearidade da curva. O volume total de cada ponto da curva e das amostras foi de 20 µL. O reativo para dosagem de proteínas Dye Reagent Concentrate foi diluído adicionando uma parte do reativo em 4 partes de água. Foram adicionados 200 µL do reativo diluído em cada ponto da curva e nas amostras, e após 5 minutos de incubação foi determinada a absorbância em 595 nm. Os pontos da curva e as amostras foram lidos em duplicatas.

4.21 ENSAIO DE ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA

A atividade fosfolipásica foi mensurada utilizando o kit Amplex Red (Molecular Probes, Eugene, EUA). Neste ensaio, a atividade fosfolipásica é monitorada usando 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazine (reagente Amplex Red), um reagente fluorogênico sensível para H_2O_2 . Primeiramente, a fosfolipase-D hidrolisa a esfingomielina à ceramida-1-fosfato e colina. A colina, por sua vez, é oxidada pela enzima colina oxidase à betaina e H_2O_2 . Finalmente, a H_2O_2 , na presença da peroxidase reage com o Amplex Red estequiometricamente (1:1), gerando um produto altamente fluorescente, o Resorufin (APPEL *et al.*, 2008; CHAVEZ-MOREIRA *et al.*, 2011). Para mensurar a atividade fosfolipásica da toxina LiRecDT7, esta foi incubada com o Reagente Amplex Red, nas concentrações de 5 μ g, 10 μ g e 20 μ g em triplicata, à 37°C por 30 minutos. Foi utilizado como controle positivo a toxina recombinante LiRecDT1 (10 μ g), e controle negativo apenas o Reagente Amplex Red sem a toxina, ambos também em triplicata à 37°C por 30 minutos. A fluorescência foi mensurada em um fluorímetro (Tecan Infinite M200, Männedorf, Switzerland) usando comprimento de onda de excitação em 540 nm e emissão em 570 nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como mencionado anteriormente, o veneno loxoscélico é capaz de desencadear um quadro cutâneo caracterizado por lesão dermonecrótica com espalhamento gravitacional, sendo que as biópsias dos acidentados demonstram um intenso infiltrado inflamatório (OSPEDAL, 2002; da SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005; CHAIM *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006a; 2006b; PALUDO *et al.*, 2009) os eventos moleculares que geram esses sinais ainda não foram completamente elucidados. Além disso, a vítima pode desenvolver também um quadro sistêmico, independentemente do quadro cutâneo, que entre outras complicações, pode apresentar-se como exantema generalizado (MAKRIS *et al.*, 2009; PIPPIRS *et al.*, 2009).

O estudo isolado das toxinas que compõem o veneno total é um tanto limitado, uma vez que a quantidade de veneno obtido através de coleta por eletroestimulação é de poucos microlitros e geralmente contém cerca de 30 µg de proteínas totais (FEITOSA *et al.*, 1998; SAMS *et al.*, 2001; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Para a purificação das toxinas diretamente do veneno seriam necessários miligramas de veneno total para que fossem obtidos poucos microgramas da toxina de interesse. Isto implica na coleta de veneno de centenas de animais para a obtenção de alguns miligramas de veneno total (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

O ponto de partida para o presente trabalho é resultante de informações derivadas das análises de Gremski e colaboradores (2010). Nesse estudo, os autores fizeram uma análise do perfil de expressão da glândula de veneno de *L. intermedia* analisando os transcritos desse tecido. A análise dos dados revelou a presença de *EST's* (*Expressed Sequence Tags*) homólogas à fosfolipases-D recombinantes já caracterizadas pelo grupo (CHAIM, *et al.*, 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006a; 2006b, APPEL, *et al.*, 2008). Algumas dessas sequências semelhantes à fosfolipases-D foram agrupadas em dois *clusters* que perfazem aproximadamente 11% dos transcritos codificantes para toxinas e que não apresentam identidade com nenhuma isoforma já caracterizada. Como esse grupo de sequências se destacou pela proporção, foi

escolhido como alvo deste presente estudo, o qual abrange a clonagem, expressão e caracterização biológica desta proteína.

Nosso grupo já identificou, clonou e caracterizou 6 isoformas recombinantes de fosfolipases-D presentes no veneno de *L. intermedia* chamadas de *Loxosceles intermedia recombinante dermonecrotic toxins* LiRecDT1 (CHAIM *et al.*, 2006), LiRecDT2 e LiRecDT3 (da SILVEIRA *et al.*, 2006a), LiRecDT4 e LiRecDT5 (DA SILVEIRA *et al.*, 2006b) e LiRecDT6 (APPEL *et al.*, 2008). A maior identidade aminoacídica verificada entre elas é entre a LiRecDT1 e LiRecDT2 com 89,4%. E a menor identidade verificada foi entre a isoforma LiRecDT3 e LiRecDT4 com 43%. Biologicamente, as isoformas também diferem entre si, umas apresentando maior atividade biológica, como a LiRecDT1, e outras com atividade biológica residual, como a LiRecDT3. Os detalhes de cada isoforma estão demonstrados na Tabela 4.

5.1 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO RNA

Para a clonagem da proteína de interesse, primeiramente procedeu-se a extração do RNA total das glândulas produtoras de veneno de *L. intermedia*.

Uma célula eucariótica típica contém, aproximadamente, $5 \cdot 10^{-5}$ μg de RNA, sendo que 80-85% dessa massa corresponde ao RNA ribossômico (rRNA). Os demais 15-20% restantes consistem de outros RNAs, a exemplo dos RNAs mensageiros (que perfazem cerca de 1-5% do RNA celular total e variam em tamanho e sequência de bases) e de uma variedade de outros RNAs de baixa massa molecular (RNA transportadores, pequenos RNAs nucleares, etc) (SAMBROOK & RUSSEL, 2001; ALBERTS *et al.*, 2008). Quando submetido à eletroforese em gel de agarose, o perfil exibido pelo RNA total da glândula de *L. intermedia* íntegro evidencia a presença de uma banda bem definida (Figura 7).

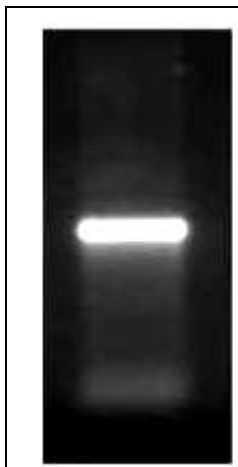


FIGURA 7- PERFIL DO RNA TOTAL ÍNTEGRO OBTIDO POR GEL DE ELETROFORESE DE AGAROSE 1%. Perfil do RNA total extraído das glândulas de veneno de *L. intermedia*, apresentando banda uma única banda de grande intensidade correspondente ao rRNA; as bandas de baixa intensidade e de tamanhos variados (*background*) corresponde aos RNA's mensageiros.

5.2 5' RACE (RAPID AMPLIFICATION OF CDNA ENDS) DA SEQUÊNCIA DA LiRecDT7

A partir dos resultados obtidos por Gremski e colaboradores (2010), verificou-se que a extremidade 3' da sequência estava completa, pois esta possuía a cauda poli-A, além de que todos os *EST's* que formam o cluster desta nova isoforma continham sequências coincidentes nessa região. Para a extremidade 5', quando alinhamos a sequência em frente às outras fosfolipases-D de *L. intermedia*, observou-se que esta região poderia estar incompleta, uma vez que apresentava um “gap” significativo. Para isso realizou-se a técnica denominada de 5' RACE, uma técnica baseada na transcrição reversa acoplada a reação em cadeia da polimerase (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Primeiramente, foram desenhados oligonucleotídeos *antisense* específicos para o fragmento conhecido da biblioteca de cDNA: *Primer antisense 1 LiRecDT7* (5' CTTGTGACACCACCTTCTGCAATC 3') e *Primer antisense 2 LiRecDT7* (5' CGAACACAACCTAGGGTCAGTTCTG 3'). Estes oligonucleotídeos específicos foram desenhados de acordo com os padrões determinados por Sambrook & Russel, 2001, levando em

consideração que eles devem ser o mais específicos possível com a região mais próxima da extremidade 5'.

O produto amplificado e analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% revelou a presença de uma banda de aproximadamente 300 pares de base (pb) (Figura 8 A). Esta banda foi recortada do gel e o produto extraído com kit específico, dosado e posteriormente ligado em vetor de clonagem pGEM-T.

A construção (inserto + vetor) foi utilizada para a transformação por eletroporação em cepa de *Escherichia coli* DH5 α eletrocompetente. Cresceram no total 5 colônias que posteriormente foram submetidas a PCR de colônia (Figura 8 B). Apenas os clones 3 e 5 foram considerados clones positivos e submetidos à reação de sequenciamento.

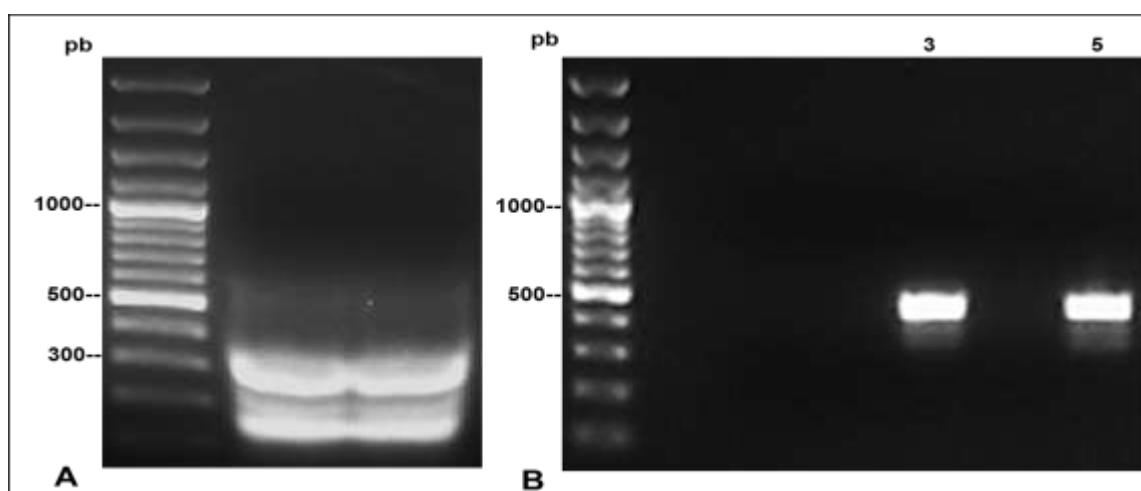


FIGURA 8- PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE 5' RACE E PCR DE COLÔNIA REFERENTES A SEQUÊNCIA DA LiRecDT7 de *L. intermedia*. Eletroforese em gel de agarose 1,5%. (A) Produto da reação de 5' RACE com tamanho de aproximadamente 300 pb. (B) PCR de colônia da construção 5' RACE + pGEM-T em *E. coli* DH5 α eletrocompetentes. Clones considerados positivos possuem amplificação na altura de aproximadamente 500 pb.

Com o resultado do sequenciamento, analisou-se a identidade entre a sequência da porção 5' e a sequência obtida através do transcriptoma da glândula produtora de veneno (*contig* 423) descrita por Gremski *et al.*, 2010. Esta análise revelou de 100% identidade entre as duas sequências, confirmando a sequência da extremidade 5' (Figura 9).

5'RACE+	TCACCAAAAACTCGGGATGGCATTACGGCGCGGGGCACAGGAACACAAGGAGGACTGTCG
Contig423+	TCACCAAAAACTCGGGATGGCATTACGGCGCGGGGCACAGGAACACAAGGAGGACTGTCG
consensus	TCACCAAAAACTCGGGATGGCATTACGGCGCGGGGCACAGGAACACAAGGAGGACTGTCG
5'RACE+	ACATGCTGTTTCCTACTGCTTTAATATTTGGCTGCTGGGCCCTCGTATAGAGGGTGCAGA
Contig423+	ACATGCTGTTTCCTACTGCTTTAATATTTGGCTGCTGGGCCCTCGTATAGAGGGTGCAGA
consensus	ACATGCTGTTTCCTACTGCTTTAATATTTGGCTGCTGGGCCCTCGTATAGAGGGTGCAGA
5'RACE+	CAATCGCCGGCCAATATGGAACATGGGGCACATGGTAAACGAAGTCTACCAAATTGACGA
Contig423+	CAATCGCCGGCCAATATGGAACATGGGGCACATGGTAAACGAAGTCTACCAAATTGACGA
consensus	CAATCGCCGGCCAATATGGAACATGGGGCACATGGTAAACGAAGTCTACCAAATTGACGA
5'RACE+	ATTTGTGGATCTTGGCGCTAATTCATCGAAACGGATATAACTTTTGATGATGACGCTAT
Contig423+	ATTTGTGGATCTTGGCGCTAATTCATCGAAACGGATATAACTTTTGATGATGACGCTAT
consensus	ATTTGTGGATCTTGGCGCTAATTCATCGAAACGGATATAACTTTTGATGATGACGCTAT
5'RACE+	GGCAGAGTACTCTTATCACGGAGTTCCCTGCGATTGCAGAAGGTGGTGTCAAGTGGGA
Contig423+	GGCAGAGTACTCTTATCACGGAGTTCCCTGCGATTGCAGAAGGTGGTGTCAAGTGGGA
consensus	GGCAGAGTACTCTTATCACGGAGTTCCCTGCGATTGCAGAAGGTGGTGTCAAGTGGGA
5'RACE+	ATATGTTAACGTCTTTTGGATGGATTGCGGCGAGCCACAACCCCTGGTGATTCCAAGTA
Contig423+	ATATGTTAACGTCTTTTGGATGGATTGCGGCGAGCCACAACCCCTGGTGATTCCAAGTA
consensus	ATATGTTAACGTCTTTTGGATGGATTGCGGCGAGCCACAACCCCTGGTGATTCCAAGTA
5'RACE+	TCGCCCAGAACTGACCCTAGTTGTGTTG
Contig423+	TCGCCCAGAACTGACCCTAGTTGTGTTGATTGAAAACGGGCGATCTTCTTCCTCTAC
consensus	TCGCCCAGAACTGACCCTAGTTGTGTTGATTGAAAACGGGCGATCTTCTTCCTCTAC

FIGURA 9- ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DO SEQUENCIAMENTO DO 5' RACE E CONTIG 423. Verifica-se 100% de identidade entre as sequências. O alinhamento foi obtido através da ferramenta *CAP3 Sequence Assembly Program* (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>). Representação parcial da sequência do *contig 423*.

5.3 CLONAGEM DA SEQUÊNCIA COMPLETA DA LiRecDT7

Com o conhecimento da porção 5' e 3' do cDNA, obteve-se a sequência completa da LiRecDT7. Com o objetivo de clonar a sequência completa desta toxina e obter um sequenciamento mais fidedigno, foram desenhados para a reação de RT-PCR 2 oligonucleotídeos *sense*: LiRecDT7 *sense 1* (5' GCTTTAATATTTGGCTGCTGGGC 3') e LiRecDT7 *sense 2* (5' TCGACA TGCTGTTTCCTACTGC 3'). O primeiro oligonucleotídeo situa-se na porção mais

próximo da extremidade 5' e o segundo em uma região mais interna da sequência, que inclui a metionina inicial. Desenhemos dois oligonucleotídeos *sense* justamente para garantirmos que ao menos um deles se anelasse mais especificamente com a isoforma em questão. Para a reação de PCR com a *Pfu* polimerase, ficou mais bem estabelecido a utilização dos oligonucleotídeos oligo (dT)₁₇ e LiRecDT7 *sense* 2.

O gel de agarose 1,5% revela uma banda específica e esperada na altura de aproximadamente 1200 pb (Figura 10 A). Esta banda foi extraída com kit de extração, o produto foi ligado ao vetor de clonagem pGEM-T e a construção transformada por eletroporação em cepa bacteriana de *E. coli* DH5α eletrocompetente. No total, 58 colônias foram escolhidas para o PCR de colônia e dentre elas, 50 colônias continham a construção. Destes, 4 clones positivos foram escolhidos para a reação de sequenciamento: clones 5, 7, 12 e 13 (Figura 10 B).

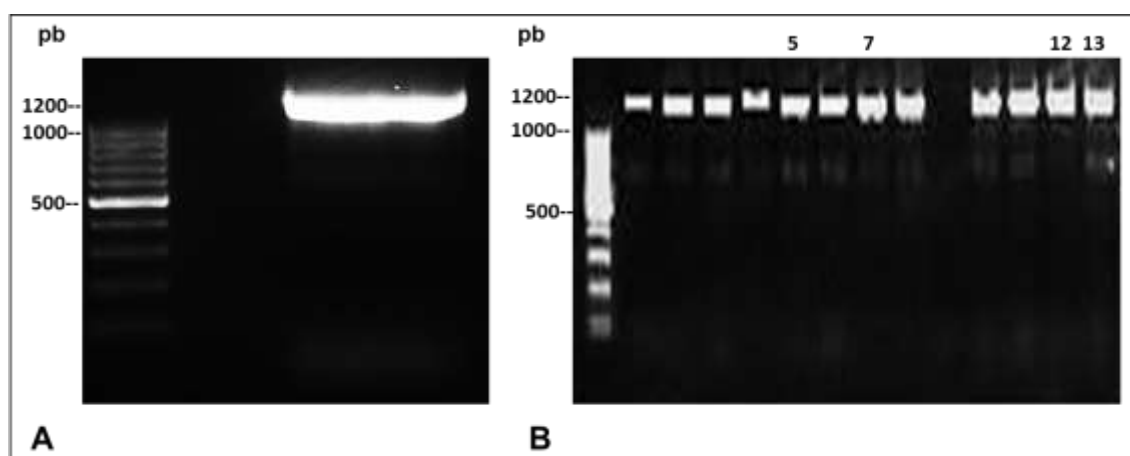


FIGURA 10- CLONAGEM DA SEQUÊNCIA COMPLETA. (A) Produto da PCR do cDNA da sequência completa da proteína. Observa-se a presença de uma banda específica em aproximadamente 1200 pb. (B) Produto da PCR de colônia da transformação em DH5α eletrocompetente. Verifica-se a presença de bandas específicas em aproximadamente 1200 pb. (Representação parcial do gel, demonstrando apenas os clones positivos que foram utilizados para a reação de sequenciamento).

A partir da sequência completa do cDNA desta toxina, foi realizada uma busca em bancos de dados utilizando a ferramenta *BLASTn*, com o objetivo de verificar a similaridade com outras sequências nucleotídicas de fosfolipases-D.

A análise mostrou que esta sequência apresenta 91% de identidade com esfingomielinase-D alfaIV2 presente no veneno de *Loxosceles hirsuta*, sendo que esta sequência foi apenas clonada e depositada no banco de dados (BINFORD, *et al.*, 2009) (Figura 11).

SMaseDLhirsuta LiRecDI7	----- CGACATGCTGTTTCTACTGCTTTAATATTGGCTGCTGGGCCCTCGTATAGAGGGTGC 60
SMaseDLhirsuta LiRecDI7	-----TGGATTATGGGGCATATGGTAAACGAGGICTACCAAATTGA 41 AGACAATCGCCGCGCAATATGGAACATGGGGCACATGGTAAACGAAGICTACCAAATTGA 120 *****
SMaseDLhirsuta LiRecDI7	CGAATTGTGGACCTTGGCGCTAATTCATCGAAACAGATATAACCTTCGATGACGACGC 101 CGAATTGTGGATCTTGGAGCTAATTCATCGAAACGATATAACCTTIGATGATGACGC 180 *****
SMaseDLhirsuta LiRecDI7	TATGGCAGAGTACTCCTATCACGGAGTCCCTGTGACTGCAAAAGGTGGTGCCACAAGTG 161 TATGGCAGAGTACTCTTATCACGGAGTCCCTGCGATTGCGAAGGTGGTGCCACAAGTG 240 *****
SMaseDLhirsuta LiRecDI7	GGAATACGTTAACACCTTTTTGGATGGATTGCGACGAGCCACAACCCAGGTGATTCCAA 221 GGAATAIGTTAACGCTTTTTGGATGGATTGCGGCGAGCCACAACCCCTGGTGATTCCAA 300 *****
SMaseDLhirsuta LiRecDI7	GTATCGCAAGAAGTGTCTAGTGGTGTTCGATTGAAAACAGGCGATCTTCTTCTCTC 281 GTATCGCCAGAACTGACCTAGTGTGTTCGATTGAAAACAGGCGATCTTCTTCTCTC 360 *****
SMaseDLhirsuta LiRecDI7	TACTGCCTACAAAGGTGGAAAGTTGTTCCGACAGAAGCTCCTGGATCGCTACTGGAACGG 341 TACTGCCTACAAAGGTGGGAAGTTGTTCCGACAGAAGCTTCTAGATCGCTACTGGAACGG 420 *****
SMaseDLhirsuta LiRecDI7	AGGAAATAACGGTGGAAAGGGCTTACATAATATTATCAATCCCGATCTTGATCATTATGC 401 AGGGAATAATGGTGGAAAGGGCTACATAATAATATCCATCCCGATATTGACCAATTATGC 480 *** *****
SMaseDLhirsuta LiRecDI7	ATTCTAACAGGATTCAAAGAAGCGCTTAAGAATGCTGGCCATGAAGAATTGCTTGCAAA 461 ATTCTAACAGGATTTAGAGAAGCGCTTAAAAATGCCAACCATGAAGAAGTCTTGATAA 540 *****
SMaseDLhirsuta LiRecDI7	AATAGGCTACGACTTCTCTGGGAATGATGATCTCGGATCGACTCGTACTGCTTGAACAA 521 AGTAGGATACGACTTCTCCGGGAATGATGACCTGAGCTCGACTCGTACTGCTTGAACAA 600 * *****
SMaseDLhirsuta LiRecDI7	AGCCGGAATAAAAGATCGAGAGCATGTGTGGCAAAGCGATGGTATCACCAACTGTATTGG 581 AGCCGGAGTAAAGATCGGGAGCACGTGTGGCAAAGCGATGGTATCACCAACTGTATTGG 660 *****
SMaseDLhirsuta LiRecDI7	ACGAGGTCTCGGTGAGTAAGAGACGCCGTGAGAAACCGGACTCTTCAAACGGATATAT 641 ACGAGGTCTTGATCGTGTAAAGAGAGCCGTGAGAAACCGGACTCTTCAAATGGATACAT 720 *****
SMaseDLhirsuta LiRecDI7	CAATAAAGTGTACTACTGGACTATAGAAAAATATGTTTCAGTCAGAGACGCCCTTGACGC 701 CAACAAAGTGTACTACTGGACTATAGAAAAATATGTTTCAGTCAGAGACGCCCTTGACGC 780 *** *****
SMaseDLhirsuta LiRecDI7	TGAAGTTGACGGCAICATGACCAACGAGCCCTGAIGTTATGTTAATGTGCTAAATGAAGG 761 TGGGGTTGACGGCAICATGACCAATGAGCCCTGAIGTTATGTTAATGTGTTAAACGAAGG 840 ** *****
SMaseDLhirsuta LiRecDI7	CAATTACAGAGGAAGGTTGAGATTAGCCACTTATGATGATAACCCATGGGAAACGTTTAA 821 TAATTACAGAGGAAGGTTGAGATTAGCCAAATTACGATGACAACCCATGGGTAACITTTAA 900 *****
SMaseDLhirsuta LiRecDI7	GAGATAA----- 828 GTAATAAGCATGAACACAAGCGTGTATTACAACGATATACTTGGTGGAGAACACCAGAGA 960 * ****
SMaseDLhirsuta LiRecDI7	----- TACCTTCTTCAGAATCTGTTGTTCAGAAATTAATAGAAATCAATGGAAATGACAAATATG 1020

FIGURA 11- ALINHAMENTO NUCLEOTÍDICO DA LiRecDI7 DE *Loxosceles intermedia* E DA ESFINGOMIELINASE-D ALFAIV2 DE *Loxosceles hirsuta* (EF535254). Observa-se uma

identidade nucleotídica de 91%. Alinhamento obtido através da ferramenta *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

A análise da sequência completa da toxina LiRecDT7 indica que esta proteína possui 280 aminoácidos e que os primeiros 19 resíduos formam provavelmente a sequência de um peptídeo sinal, importante para o endereçamento para Retículo Endoplasmático (RE), muito típico de proteínas que são secretadas (Figura 12). Segundo o programa *Protparam*, o ponto isoelétrico calculado desta proteína é de 5.94 e sua massa molecular calculada é de aproximadamente 34.4 kDa. Como demonstrado por Kalapothakis e colaboradores (2007), as toxinas dermonecróticas pertencentes a espécies *Loxosceles intermedia* possuem massa molecular entre 30 – 35 kDa e ponto isoelétrico variando de 4 a 9, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

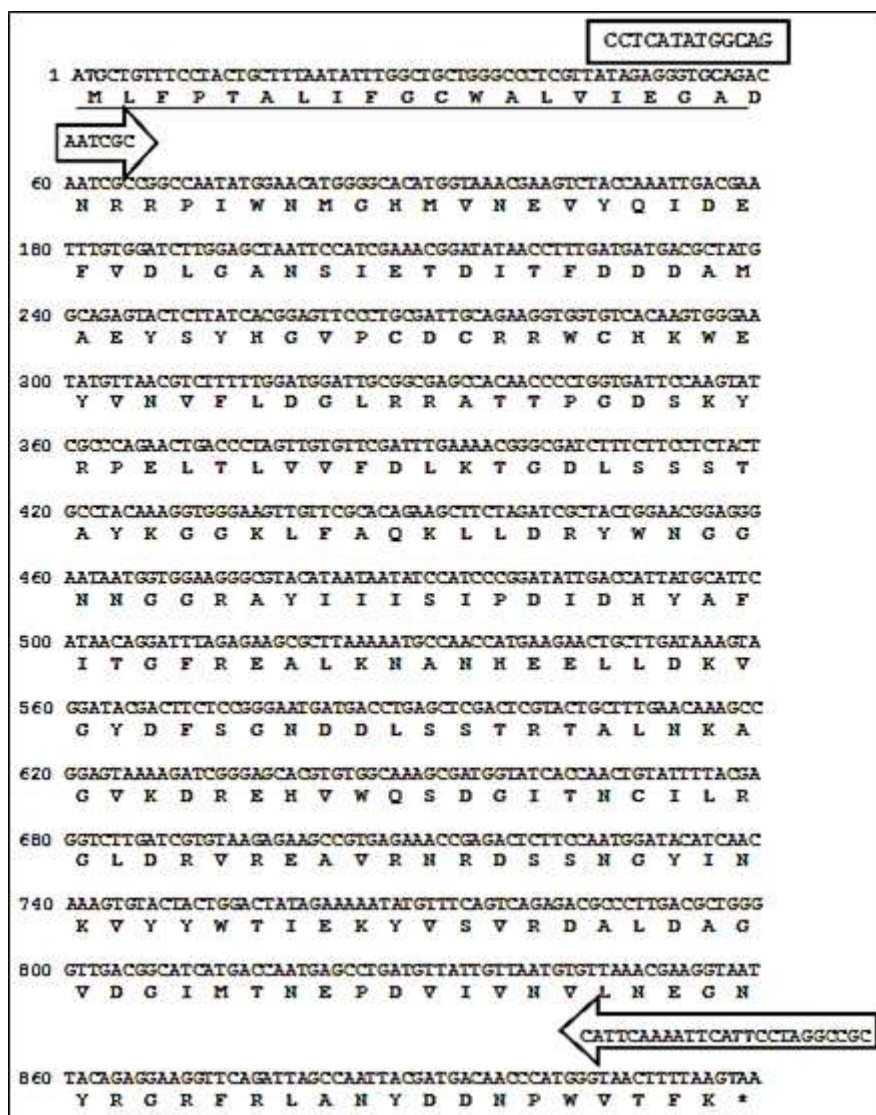


FIGURA 12- SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA E AMINOACÍDICA DA ISOFORMA LiRecDT7. A predição da sequência aminoacídica foi através da ferramenta *ORF Finder*. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores com sítios para enzimas de restrição para a subclonagem molecular da sequência estão dentro das setas. A sequência em destaque sublinhada mostra a sequência do peptídeo sinal, predito pela ferramenta *SignalP 3.0 Server*. O asterisco (*) representa o códon de parada.

Também verificou-se a identidade aminoacídica da LiRecDT7 frente às isoformas de fosfolipase-D de *L. intermedia* descritas pelo grupo (APPEL, *et al.*, 2008; CHAIM, *et al.* 2006; da SILVEIRA *et al.*, 2006a; 2006b) e com a Loxtox i5 (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007), o qual está demonstrada na figura 13 e tabela 5. Dentre as isoformas descritas, a LiRecDT7 possui maior identidade (71%) com a LiRecDT6 com 71% (APPEL *et al.*, 2008) e menor identidade com LiRecDT3 (45%) (da SILVEIRA *et al.*, 2006a). Todas estas evidências indicam

que esta sequência representa uma nova isoforma pertencente à família das fosfolipases-D.

Bioquimicamente, a LiRecDT6 possui alta atividade esfingomielinásica, provocando respostas inflamatórias em coelhos e também várias reações nocivas como, edema, distúrbios na permeabilidade vascular, eritema, isquemia e dermonecrose. Em camundongos, esta toxina causa agregação plaquetária além de causar a letalidade neste animais com 100 µg de toxina recombinante em 16h de exposição (APPEL *et al.*, 2008). Em contraste, a LiRecDT3 é a isoforma recombinante que menos possui atividade biológica. Quando testada a sua atividade esfingomielinásica, esta toxina possui apenas uma atividade residual quando comparada com outras isoformas. Além disso, biópsias de tecido de coelho revelam que quando expostos a esta isoforma, não ocorre dermonecrose, apenas é observada a formação de edema e massiva resposta inflamatória na região da exposição (da SILVEIRA *et al.*, 2006a).

Além das taxas de identidade com as isoformas do grupo, também verificamos a taxa de identidade da LiRecDT7 em frente a isoforma Loxtox i5 (AAP97092), descrita por Kalapothakis *et al.* (2007). Este alinhamento mostrou 58% de identidade aminoacídica entre ambas as sequências (Tabela 6). A Loxtox i5 não pode ser classificada em nenhum dos grupos propostos por este autor, por não possui identidade aminoacídica com nenhuma das isoformas de fosfolipases-D de *L. intermedia* encontradas descritas na literatura. Não encontramos na literatura trabalhos que caracterizam bioquimicamente e biologicamente a Loxtoxi5

TABELA 6- RELAÇÃO ENTRE A IDENTIDADE DA SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA ENTRE A NOVA ISOFORMA LiRecDT7 E AS ISOFORMAS DESCRITAS PELO GRUPO E A Loxtoxi5 DESCRITAS POR KALAPOTHAKIS *et al.* (2007).

	LiRecDT1	LiRecDT2	LiRecDT3	LiRecDT4	LiRecDT5	LiRecDT6	Loxtoxi5
LiRecDT7	63%	64%	45%	60%	46%	71%	58%

LiRecDT1	1	MLPYIIVLVLCMSVLSQAQTDDEERAGNRRPIWMGMVNAIGQIDFVNLGANSIETD
LiRecDT2	1	-----DVEERADRRPIWMGMVNAIGQIDFVNLGANSIETD
LiRecDT3	1	MLLPATISFIWVAVFIOBANGHAAERADSRKPIWDIAHVNDLGLVDEYLGEGANGLETD
LiRecDT4	1	MLLHIALILGCMVVFSEGAETDVAERADRRPIWNMGHMVNGIWOIDCFVDLGANSIETD
LiRecDT5	1	MQLFIILCLAGSAVQLEGTELDGERADRRPIWNIAHVNDKGLIDEYLDGANSVESD
LiRecDT6	1	MLCFVILFFCCGTVLLEGADIDEIEHADRRPIWNMGHMVNAVQIDFVDLGANAIETD
LiRecDT7	1	MLFPTALIFGCAATVIEG-----ADNRRPIWNMGHMVNEVQIDFVDLGANSIETD
LiRecDT1	61	VSFDENANPEYTYHGIPCDCCRNCKKYENFNDFLKGLRSATTPGNSKYQEKILVVVFDLK
LiRecDT2	40	VSFDENANPEYTYHGIPCDCCRSCLKWNFNDFLKGLRSATTPGNAKYQAKLILVVVFDLK
LiRecDT3	61	VAFIADCTAKMYHGVPCDCRSCTRTCEFTKMYDYIRQLTTPGNSKENSQILILIMDLK
LiRecDT4	61	INFDNNGKPVYTYHGVPCDCRSCLNWEVCEFLTALRHRTTPGDKLYKEKILIFVFLMK
LiRecDT5	61	VSFDNNGKPEKMLHGSPCDCRSCKRQMSFADYLDYIRQLTTPGDKERENLILVMLDLK
LiRecDT6	61	VTFTKSANAETTYHGVPCDCHRWCKKWEYVNDFLKALRRATTPGDAKYESQILILVVFDLK
LiRecDT7	53	ITFDDAMAETTYHGVPCDCRRCKHWEYVNVFLDGLRRATTPGDSKYRPELILVVVFDLK
LiRecDT1	121	TGSLYDNOANDAGKKLAKNLLQHYWNNGNNGGRAYIVLSIPDLNHYPLIKGFIDQLTKEG
LiRecDT2	100	TGSLYDNOANDAGKKLAKNLLQHYWNNGNNGGRAYIVLSIPDLNHYPLIKGFIDQLTQEG
LiRecDT3	121	LNGEERNVAYAGKSVAEKLLSGYWONGKSGARAYIVLSLETITRPNFISGFDAIKASG
LiRecDT4	121	TNSLYDNOAYCAGVNMTDIFKYWNNGNNGGRAYIVLSIPDLNHYDLIKGFRETITKKG
LiRecDT5	121	LKKLSSEQAYSAGQEVASQMLDRYWKRGESGARAYIVLSIPTITRVTFVNGFYDLKHSEG
LiRecDT6	121	TDVLTASTAYDAGKDFAKELLOHYWNGGNGGRAYIVLSIPDLNHYKFINGFKCOLKTQG
LiRecDT7	113	TGDLSSSTAYKGGKLFQAKLLDRYWNGGNGGRAYIVLSIPDLNHYAFITGFBALKNAN
LiRecDT1	181	HPELMDKVGHDFSGNDDIGDVGRAYKKAGITG--HIWQSDGITNCLRGLSRVNAAVANR
LiRecDT2	160	HPELMDKVGHDFSGNDALGDVGNAYKKAGISG--HIWQSDGITNCLLRGLDRVNAQIANR
LiRecDT3	181	HEELDEKIGWDFSGNEDLGEIRRVYQKNGIED--HIWQSDGITNCLPRGDYRTTEAMKKK
LiRecDT4	181	HEELMEKVGVDYFSANDNIPDVEKAYKMGVTD--HIWQSDGITNCLRGLSRVNEAVNR
LiRecDT5	181	FDQYREKVGVDYFSGNEDLEDTCKILKSRIILD--HIWQSDGITNCLFRIMKRLKAAIER
LiRecDT6	181	HEELAKVGVDYFSGNEDLSSTRAAEQKAGVQDKEHIWQSDGITNCLRGLSRVNEAVNR
LiRecDT7	173	HEELLDKVGYDFSGNDDLSTRTALNKAQVQDRBHWQSDGITNCLRGLDRVNEAVNR
LiRecDT1	239	D-SANGFINKVYYWTVDKRSTTRDALDAGVDGIMTYNPDVITDVLNBAAYKKKPRVATYD
LiRecDT2	218	D-SANGFINKVYYWTVDKRSTTRDALDAGVDGIMTYNPDVITDVLNBSAYKKKPRVASYE
LiRecDT3	239	NDPNKYITLKVYIWSIDKSSIRNALRIGVDAVMTNYPARVKSILRSESSGTHRMATYD
LiRecDT4	239	D-SG-GVINKVYYWTVDKRSTTRDALDAGVDGIMTYNPDVINDVLKAGAYKKKPRMATYE
LiRecDT5	239	D--SNGYMKVYIWSVDKYITNRKALRAGADGMITNPFKRLVSVLNREFFSGKPRLATYN
LiRecDT6	241	D-SSNGYINKVYYWTVDKRSTTRDALNACADGIMTYNPNVIMDVLRENDEKKGKPRMATYN
LiRecDT7	233	D-SSNGYINKVYYWTEKVVSRDALDAGVDGIMTYNPDVIVNVNLNEGNYRGPRLANYD
LiRecDT1	298	ENPWVTFKK
LiRecDT2	277	DNPWETFKK
LiRecDT3	299	DNPWQK---
LiRecDT4	297	DNPWVTFKA
LiRecDT5	297	DNPWERTTG
LiRecDT6	300	DNPWETFK-
LiRecDT7	292	DNPWVTFK-

FIGURA 13- ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS AMINOACÍDICAS DA LiRecDT7 e ISOFORMAS RECOMBINANTES DO VENENO DE *Loxosceles intermedia*. O alinhamento aminoacídico foi obtido pelo site <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> e o sombreamento através da ferramenta http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html, na qual, a positividade aumenta do branco para o preto. Em preto, os resíduos de aminoácidos conservados, e em cinza, os resíduos com substituições conservativas. Os resíduos de aminoácidos conservados e que constituem o sítio catalítico estão destacados em amarelo; os resíduos de cisteína estão destacados em vermelho; o asterisco (*) representa o resíduo da alanina inicial. As sequência comparadas foram: DQ 218155, DQ266399, DQ218155, DQ431848, DQ431849 e DQ267927.

De acordo com o cladograma de similaridade mostrado na Figura 14, a LiRecDT7 possui maior homologia com fosfolipase-D alphaVI2 de *Loxosceles hirsuta*. Binford *et al.* (2009) por meio de análises filogenéticas, inclui as espécies *L. intermedia* e *L. hirsuta* em um mesmo grupo denominado de grupo das aranhas *spadicea*, corroborando com as análises mostradas nesse trabalho.

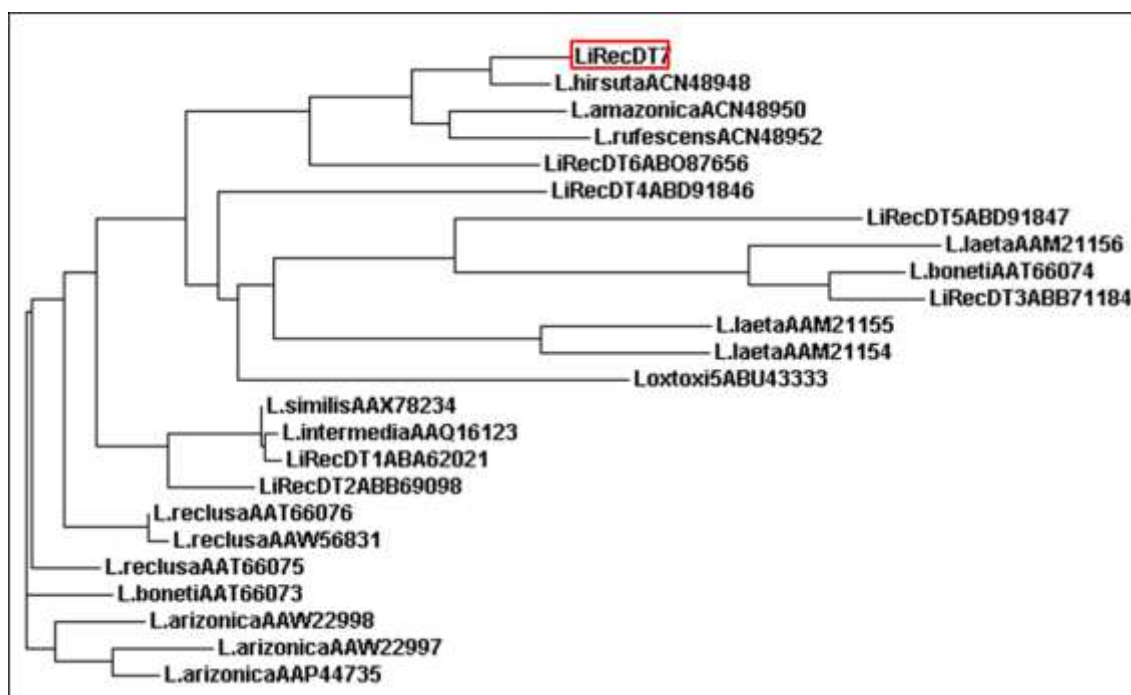


FIGURA 14- Cladograma de similaridade entre fosfolipases-D do gênero *Loxosceles* estabelecido com base nas sequências aminoacídicas no banco de proteínas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e na sequência obtida da LiRecDT7 (Figura 12). A árvore foi constituída com auxílio do programa ClustalW.

Como demonstrado na Figura 13, o alinhamento mostra que os resíduos de aminoácidos que formam o sítio catalítico das isoformas recombinantes de fosfolipases-D de *L. intermedia* descritas pelo nosso grupo estão conservados. As análises do cristal da isoforma recombinante de fosfolipase-D de *L. intermedia* (LiRecDT1), mostram que o sítio catalítico desta enzima é formado por dois resíduos de aminoácidos de histidina nas posições 12 e 47, e por um íon Mg^{+2} . Esta estrutura do sítio catalítico é hexacoordenada pelos resíduos de aminoácidos Glu32, Asp34, Asp91, uma molécula de água e dois oxigênios de

PEG4 (GIUSEPPE *et al.*, 2011). Toda essa estrutura de coordenação do íon é estabilizada por pontes de hidrogênio que são formados pelos resíduos de aminoácidos Asp34, Asp52, Trp230, Asp233 e Asn252, e também por uma pequena ponte com Gly480 (MURAKAMI *et al.*, 2005; MURAKAMI *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2006; GIUSEPPE *et al.*, 2011). Entretanto, observa-se uma substituição conservativa no resíduo Asp233→Glu233 na sequência da LiRecDT7.

O ácido aspártico (Asp) geralmente fica localizado na superfície das proteínas. Mas algumas vezes, ele pode estar localizado no interior da proteína. Este aminoácido frequentemente está envolvido na formação de pontes de hidrogênio que auxiliam na estabilização da estrutura protéica, podendo também estar envolvido em sítios ativos ou de ligação com muitas proteínas. Já o ácido glutâmico (Glu) é também um aminoácido carregado e polar, porém, o ácido aspártico possui uma cadeia lateral menos volumosa, se comportando de maneira menos flexível quando no interior da proteína. Isso confere ao ácido aspártico uma preferência ligeiramente maior de se envolver em sítios ativos de proteínas, como é o caso do resíduo Asp233 nas fosfolipases-D de *Loxosceles*, que é altamente conservado. Isso ocorre também no exemplo clássico do sítio ativo de serino proteases como a tripsina, cujo mecanismo é baseado na tríade de aminoácidos Asp-His-Ser. Nesse contexto, a substituição do ácido aspártico pelo ácido glutâmico (Asp→Glu) é bastante rara, embora seja possível que o ácido glutâmico desempenhe um papel semelhante (BETTS e RUSSELL, 2003). No entanto, somente testes de atividade enzimática e/ou biológica poderão responder se essa substituição em um dos resíduos envolvidos no mecanismo de catálise afetará de forma significativa o comportamento dessa isoforma de fosfolipase-D.

Até agora, nesta família de enzimas, os resíduos de aminoácidos essenciais para a ligação do íon metálico divalente (Mg^{+2}), e hidrólise do substrato mostravam-se conservados, no entanto, a menor diferença nestas sequências pode resultar na diminuição ou ausência completa de atividade hidrolítica sobre a esfingomielina (MURAKAMI *et al.*, 2006).

A presença de isoformas reflete um processo evolutivo comum em glândulas de veneno de aranhas (KALAPOTHAKIS *et al.*, 1998; CARDOSO *et*

al., 2003), e para *L. intermedia* (KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007). Várias isoformas de uma mesma proteína variam na sua intensidade de atividade e/ou possuem atividades biológicas distintas. Por exemplo, comparando a LiRecDT3 em frente à outras isoformas, esta não causa pouca dermonecrose em coelho e possui baixa atividade esfingomielinásica (da SILVEIRA *et al.*, 2006a). Podemos propor que algumas mutações que ocorrem nos genes que codificam para este tipo de proteínas podem alterar e/ou inativar a proteína, ou até mesmo, fatores do ambiente com temperatura, pH e sais podem modular a atividade enzimática. KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007).

Encontram-se na literatura trabalhos sugerindo que muitos genes parálogos, ou seja, genes originados a partir de eventos de duplicação, são expressos pela glândula produtora de veneno de *Loxosceles* (BINFORD *et al.*, 2005; BINFORD *et al.*, 2009; KALAPOTHAKIS *et al.*; 2007; SOLLID *et al.*; 2005). Neste caso, a diversidade observada para esta família de proteínas pode ser devida a eventos de duplicação (anteriormente mencionado), mutação e recombinação entre os genes. Além disso, Escoubas (2006) sugere que podem ter ocorrido mecanismos não convencionais, como “hipermutação” que consiste em um processo duplo onde ocorre mutação na sequência e ao mesmo tempo, os mecanismos moleculares de transcrição preservam os resíduos de cisteínas, conservando a estrutura molecular da proteína. Estes eventos contribuem para a geração de grande número de genes que codificam para esta família de toxina.

5.4 SUBCLONAGEM DA LiRecDT7

A partir da sequência completa da LiRecDT7 clonada em vetor de clonagem pGEM-T, o próximo passo foi subcloná-la em vetor de expressão. O sistema pET de expressão em *E. coli* vem sendo amplamente utilizado. Como as outras isoformas descritas pelo grupo foram subclonadas em pET-14b, escolheu-se esse vetor por possuir um sistema plasmidial que fusiona uma cauda de 6 histidinas (*6xHis-tag*) à proteína recombinante de interesse, o que

permite a purificação desta em uma única etapa de cromatografia de afinidade ao metal níquel (Ni^{+2}) (Figura 15).

O primeiro passo foi desenhar oligonucleotídeos específicos para a LiRecDT7 com sítios de reconhecimento para enzimas de restrição. Como o sistema heterólogo de expressão escolhido é o sistema procariótico, o qual não possui Retículo Endoplasmático para o processamento e endereçamento das proteínas, os oligonucleotídeos foram desenhados a partir do primeiro aminoácido da proteína madura até o códon de terminação. São eles os oligonucleotídeos iniciadores para a subclonagem em pET-14b: LiRecDT7 *NdeI* sense (5' CCTCA/TATGGCAGAAATCGC 3') e LiRecDT7 *BamHI* antisense (5' CGCCGGATC/CTTACTTAAAAGTTAC 3') (Figura 12). Dentro do amplo sítio de clonagem existente no pET-14b, como demonstrado na Figura 16, foram escolhidas as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* por vários motivos: estas enzimas preservam o sítio de ligação para o ribossomo (rbs); não possuem sítios de reconhecimento muito longos; a distância entre os dois sítios das enzimas é mais de 10 nucleotídeos; e a sequência de cDNA LiRecDT7 não possui sítios de reconhecimento para estas enzimas.

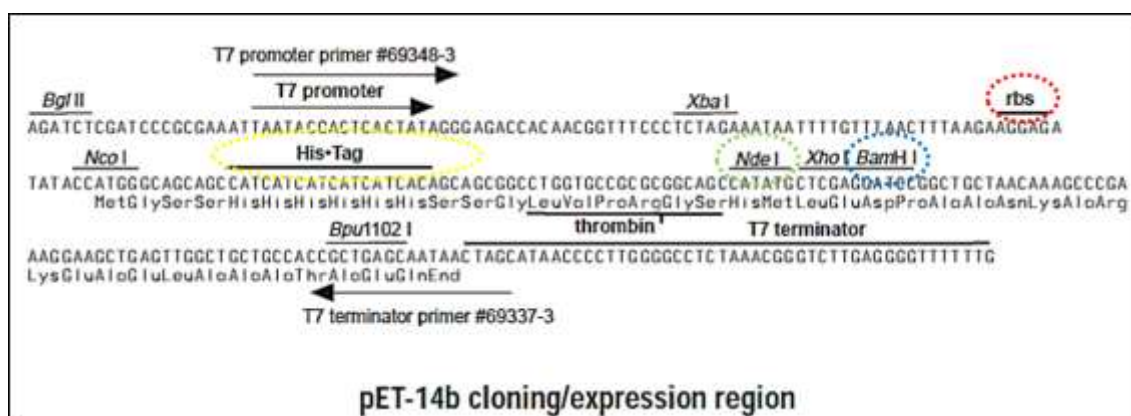


FIGURA 15- REPRESENTAÇÃO DO SÍTIO DE CLONAGEM DO VETOR DE EXPRESSÃO pET- 14b. Em destaque: sequência de reconhecimento para o ribossomo (circulado em vermelho); 6x His-Tag (circulado em amarelo); Enzimas de restrição *NdeI* *BamHI* (circulados em verde e azul, respectivamente).

A análise do produto da PCR revelou uma banda específica da altura esperada de 900pb, pois a sequência nucleotídica da proteína madura possui

900 nucleotídeos (Figura 16 A). Posteriormente, juntamente com o vetor pET-14b circularizado, o fragmento foi submetido a reação de digestão com as enzimas de restrição *Nde I* e *Bam HI*, e os produtos purificados. Em seguida, foi realizada a ligação do inserto ao vetor digerido com as mesmas enzimas em uma proporção de 3:1 e transformada por eletroporação em cepa *E. coli* DH5 α eletrocompetente. As colônias foram submetidas a PCR de colônia com os oligonucleotídeos do vetor: *T7 sense* 5' AATACGACTCACTATAG 3' e *T7 terminator* 5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'. O gel da PCR de colônia revelou a presença de apenas um clone positivo na altura esperada de aproximadamente 1000pb (Figura 16 B) que foi submetido à reação de sequenciamento.

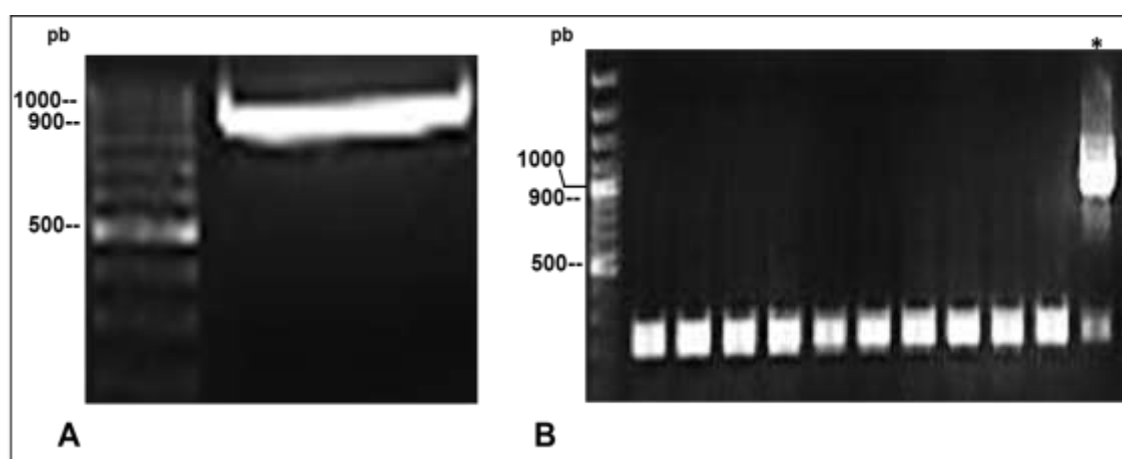


FIGURA 16- SUBCLONAGEM DA SEQUÊNCIA MADURA DA LiRecDT7 EM pET-14b. (A) Produto da PCR com os oligonucleotídeos específicos para LiRecDT7 madura com sítios de restrição para *Nde I* e *Bam HI*. Banda específica visualizada na altura esperada de aproximadamente 900pb. (B) Produto da PCR de colônia com os oligonucleotídeos iniciadores do vetor pET-14b. Gel representativo, mostrando a única banda correspondente ao clone positivo na altura de aproximadamente 1000pb (*).

A análise da sequência nucleotídica da LiRecDT7 clonada em vetor de expressão pET-14 revelou que a sequência não sofreu nenhuma mutação durante todos os processos de ampliações (PCR's), e que esta também estava na fase de leitura correta.

5.5 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA LiRecDT7

A escolha da cepa de expressão é muito importante, pois algumas questões devem ser levadas em consideração. Cepas de expressão devem ser deficientes em proteases e manter a expressão do plasmídeo estável (SORENSEN e MORTENSEN, 2005). As cepas bacterianas são geralmente escolhidas para a expressão de proteínas recombinantes devido a sua facilidade de manipulação, por possuírem crescimento rápido em meios de cultura simples, por geralmente expressarem grandes quantidades de proteína recombinante e por ser um método relativamente barato.

Com base em trabalhos realizados pelo grupo, a primeira cepa de bactéria escolhida para a expressão da toxina LiRecDT7 foi a cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Esta cepa possui um sistema bastante simples e também possui o plasmídeo pLysS, o qual reprime a expressão basal antes da indução da expressão. Para todas as isoformas de fosfolipases-D recombinantes de *L. intermedia*, esta cepa demonstrou ser bastante vantajosa por grandes quantidades das proteínas solúveis e ativas. Para a LiRecDT1, por exemplo, obteve-se após a purificação, 24mg/litro de cultura (CHAIM *et al.*, 2006).

Inicialmente, foi realizado um teste piloto de mini-expressão a fim de padronizar os parâmetros que influenciam na expressão, como a concentração de indutor (IPTG), tempo de indução e temperatura. Conforme demonstrado na Figura 17, observou-se a presença de uma banda que aumenta de intensidade ao decorrer da expressão na altura de aproximadamente 34kDa. Com a análise dos géis SDS-PAGE 12,5%, observou-se que não há diferença significativa nos níveis de expressão nas concentrações de 0,01 e 0,05mM de IPTG (Figura 17 A e B). Em contrapartida, observa-se que na concentração de 0,1mM de IPTG o nível de expressão não foi tão satisfatório quando comparado com as outras concentrações de indutor (Figura 17 C). Também podemos visualizar que parte da proteína recombinante está sendo expressa na forma solúvel (sobrenadante).

Com base no resultado deste teste de mini-expressão, e também no conhecimento do padrão de expressão das outras isoformas de fosfolipases-D recombinantes em BL21(DE3)pLysS, determinou-se que a concentração de

0,05mM de IPTG em 4h de expressão à 30°C seriam as condições iniciais de expressão em larga escala.

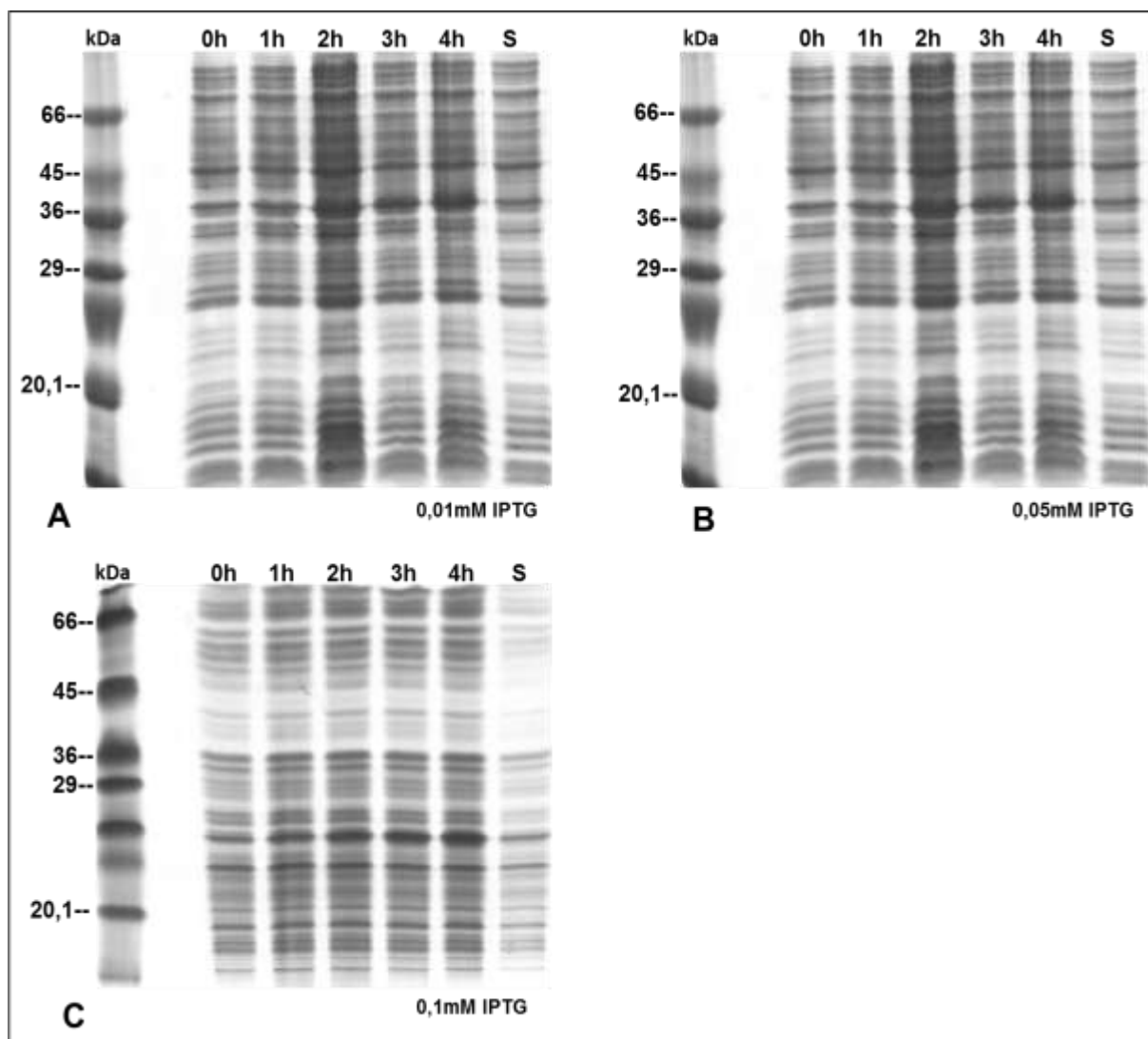


FIGURA 17- TESTE DE MINI-EXPRESSÃO DA TOXINA LiRecDT7 EM CEPA BACTERIANA BL21(DE3)pLysS. A proteína foi expressa à 30°C em diferentes concentrações de IPTG (0,01mM; 0,05mM e 0,1mM), e tempo de expressão (1h; 2h; 3h e 4h). Em cada gel está demonstrado o marcador, os tempos de expressão, a concentração de IPTG e o sobrenadante após o processo de lise das bactérias (S).

A partir das análises realizadas em SDS-PAGE 12,5% das amostras coletadas da expressão em larga escala, podemos observar uma banda que corresponde a proteína recombinante na altura de aproximadamente 34kDa (Figura 18 setas). Os resultados mostram que no tempo de 4h, a expressão da

proteína recombinante é pouco satisfatória. Também observamos pouco rendimento da porção solúvel no sobrenadante após a lise das bactérias. Em contrapartida, no *pellet*, após a centrifugação da lise bacteriana, encontramos grandes quantidades dessa proteína, sugerindo que esta proteína pode estar sendo expressa na forma insolúvel em corpos de inclusão.

Para todas as isoformas de fosfolípases-D recombinantes de *L. intermedia*, a cepa BL21(DE3)pLysS demonstrou ser bastante vantajosa por grandes quantidades das proteínas solúveis e ativas. Para a LiRecDT1, por exemplo, obteve-se após a purificação, 24 mg/litro de cultura (CHAIM *et al.*, 2006). Quando comparamos a taxa de expressão da LiRecDT7 em frente as outras isoformas, observamos que as condições testadas com essa cepa são pouco satisfatórias. As análises de bioinformática revelam que a LiRecDT7 é muito semelhante com a LiRecDT6, com 71% de identidade aminoacídica. Esta isoforma possui alta taxa de expressão e um bom rendimento após a purificação (APPEL *et al.*, 2008). A partir desta semelhança, era esperado uma taxa de expressão elevada para a LiRecDT7, já que é necessário uma quantidade razoável para purificá-la a por cromatografia de afinidade.

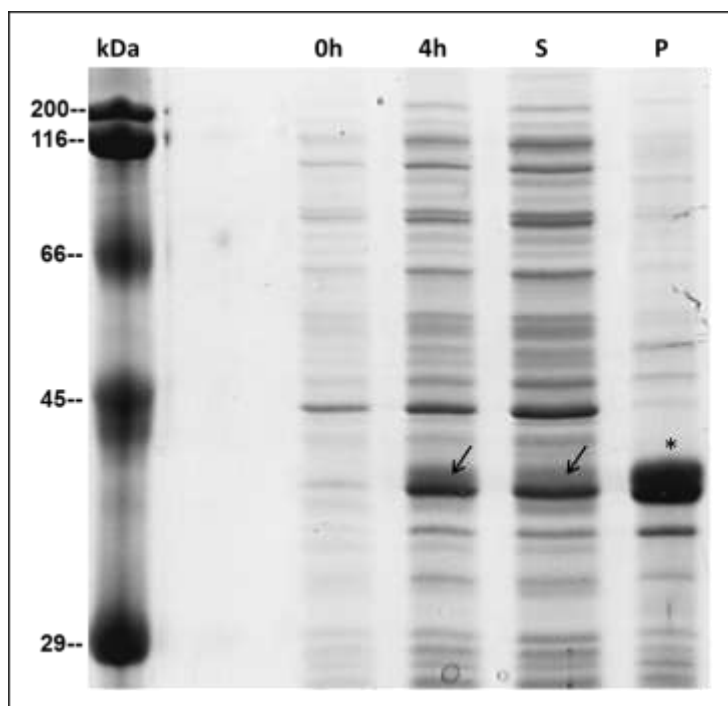


FIGURA 18- EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DA TOXINA LiRecDT7 EM CEPA BACTERIANA DE EXPRESSÃO BL21(DE3)pLysS. A proteína foi expressa em 1 litro de cultura com 0,05mM de IPTG, à 30°C por 4h. À esquerda, indicado o marcador de massa molecular. Na sequência, o tempo anterior e após a indução da expressão (0h e 4h, respectivamente); o sobrenadante e o *pellet* (S e P, respectivamente). As setas correspondem à banda da proteína recombinante na altura de aproximadamente 34.4kDa; e o asterisco (*) corresponde à banda da proteína recombinante na forma insolúvel no *pellet* bacteriano.

Corpos de inclusão são um conjunto de agregados de proteínas que podem ser formados durante a expressão decorrente de situações como: altíssima taxa de expressão da proteína recombinante dentro do citoplasma da célula, desfavorecendo o ambiente intracelular e prejudicando dobramento correto das proteínas (SORENSEN e MORTENSEN, 2005), composição do meio de cultura, temperatura de crescimento e a disponibilidade de chaperonas (VENTURA e VILLAYERDE, 2006).

Com o objetivo de melhorar a solubilidade da LiRecDT7, alguns parâmetros foram levados em consideração. Segundo Sambrook & Russel (2001), o intervalo de 20-37°C de expressão deve ser testado. Geralmente expressões em baixas temperaturas favorecem maior estabilidade, diminuição da atividade das proteases e dobramento correto para as proteínas, pois as interações hidrofóbicas que determinam a formação de corpos de inclusão dependem da temperatura (SORESEN e MORTENSEN, 2005; SAHDEV *et al.*,

2008). A partir disso, escolheu-se a temperatura de 20°C para a expressão, e também levou-se em consideração a aeração da cultura em relação ao volume do frasco utilizado. Na figura 19 A, observa-se uma melhora em 20 horas de expressão à 20°C, embora a proporção de proteína recombinante solúvel mostrou-se semelhante à expressão à 30°C. Por isso, optou-se em manter a expressão nas condições iniciais de 30°C em um volume de 1L de cultura.

Um fator que também pode auxiliar no dobramento correto de uma proteína recombinante durante sua expressão é a adição do seu co-fator no meio de cultura (SAHDEV *et al.*, 2008). Verificou-se que a adição de íons metálicos no meio de cultura favoreceu a solubilidade para uma serino protease de veneno da serpente *Gloydius shedaoensis* (YANG *et al.*, 2003). As fosfolipases-D de veneno de *Loxosceles* requerem o íon Mg^{+2} para realizar a hidrólise do seu substrato (MURAKAMI *et al.*, 2006; GIUSEPPE *et al.*, 2011). Com base nessa informação, adicionou-se 0,1mM do íon Mg^{+2} no meio de cultura, resultado que mostrou pouca melhora na solubilidade da proteína (Figura 19 B).

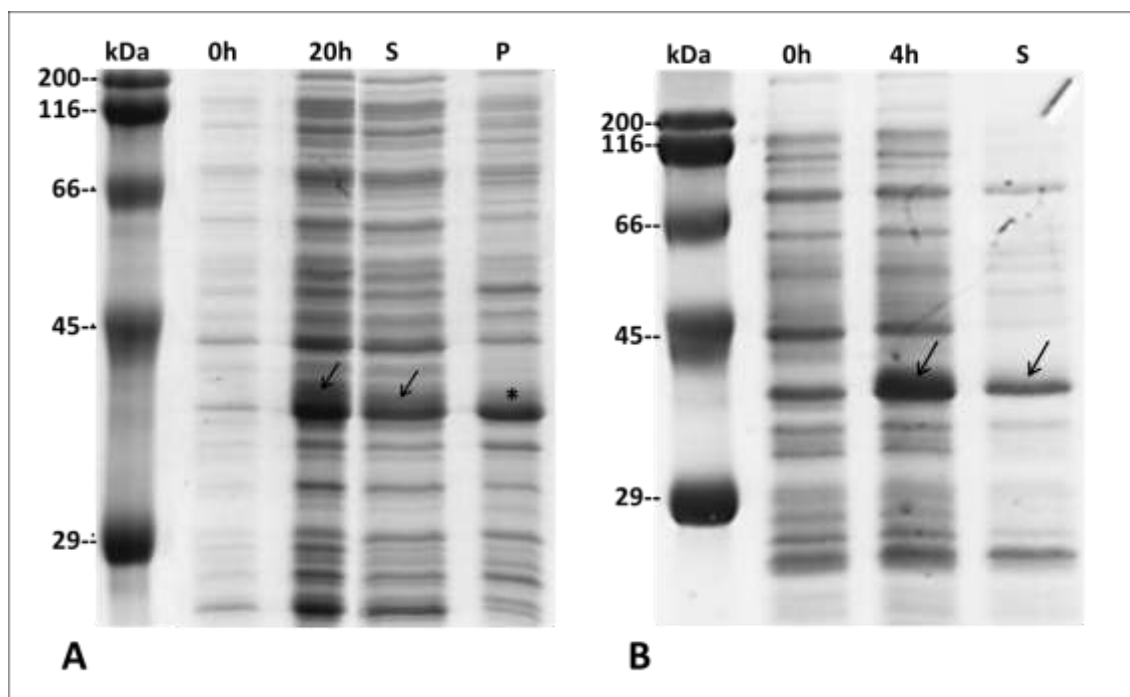


FIGURA 19- TESTE DE SOLUBILIDADE DA TOXINA LiRecDT7 EXPRESSA EM CEPA BACTERIANA BL21(DE3)pLysS. (A) A proteína recombinante foi expressa em 200mL de cultura à 20°C por 20h, com 0,05 mM de IPTG. (B) A proteína recombinante foi expressa à 200mL de cultura à 30°C por 4h, com 0,05 mM de IPTG e 0,1mM de Mg^{+2} . As setas correspondem à banda da proteína recombinante na altura de aproximadamente 34.4kDa; asterisco (*) corresponde à banda da proteína recombinante na forma insolúvel no *pellet* bacteriano.

Alguns pesquisadores tem adotado uma estratégia de co-expressar proteínas formadoras de pontes dissulfeto juntamente com a proteína recombinante para promover a solubilidade e o dobramento correto da proteína (BRODYK, 2009). Cepas de *E. coli* possuem um conjunto de enzimas que realizam reações de oxidação, redução e isomerização auxiliam na formação de pontes dissulfeto nas proteínas (KADOHURA *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2011). Estas enzimas ficam localizadas no periplasma da bactérias e pertencem a uma família de proteínas chamadas de tioredoxina e possuem o sistema Dsb. Novas cepas vêm sendo desenvolvidas para auxiliar na formação de pontes dissulfeto, entre elas encontramos a cepa de *E. coli Shuffle* (New England Biolabs), que expressa a enzima DsbC no seu citoplasma. Esta enzima DsbC atua como uma isomerase na formação correta das pontes dissulfeto da proteína recombinante, e também, como uma chaperona auxiliando no dobramento correto tanto de proteínas com ou sem pontes

dissulfeto na estrutura. Além disso, essa cepa possui a deleção dos genes para glutarredoxina redutase e tioredoxina redutase, o que permite a formação de pontes dissulfeto no citoplasma.

Por essas propriedades da cepa *E. coli* Shuffle, partiu-se para a expressão da LiRecDT7 por essa cepa. Primeiramente foi realizado um teste piloto de mini-expressão, a fim de padronizar os parâmetros que influenciam na expressão. As análises dos géis de mini-expressão (Figura 20) mostram uma banda na altura esperada de aproximadamente 34kDa, e no decorrer do tempo essa banda aumenta de intensidade. Também observamos uma considerável melhora no rendimento da proteína recombinante expressa na forma solúvel presente no sobrenadante.

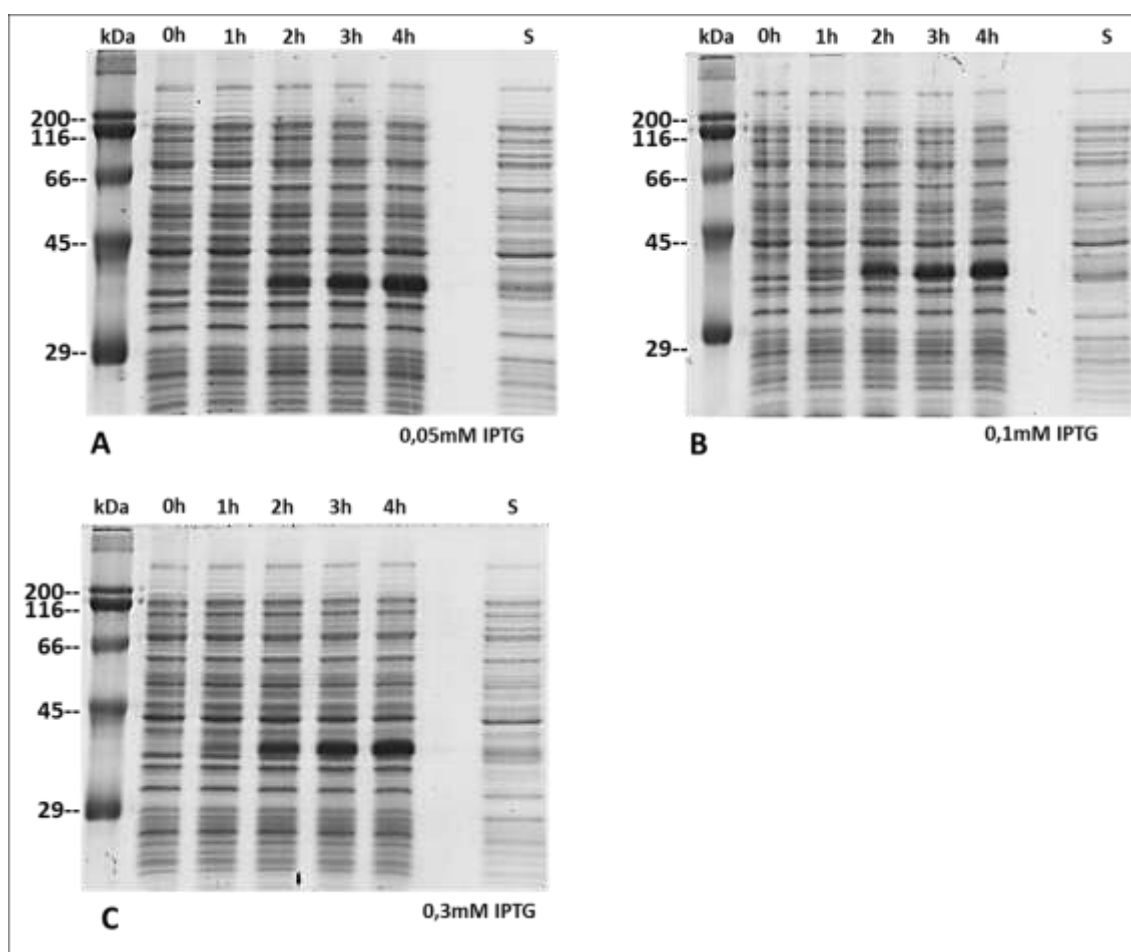


FIGURA 20- TESTE DE MINI-EXPRESSÃO DA TOXINA LiRecDT7 EM CEPA BACTERIANA *E. coli* Shuffle. A proteína foi expressa à 30°C em diferentes concentrações de IPTG (0,05mM; 0,1mM e 0,3mM), e tempo de expressão (1h; 2h; 3h e 4h). Em cada gel está demonstrado o

marcador, os tempos de expressão, a concentração de IPTG e o sobrenadante após o processo de lise das bactérias (S).

Com base nos resultados do teste de mini-expressão, escolheu-se a condição de 0,05mM de indutor (IPTG), temperatura de expressão à 30°C por 4h. A análise do gel SDS-PAGE 12,5% revela uma banda correspondente a proteína LiRecDT7 recombinante na altura de aproximadamente 34kDa (Figura 21).

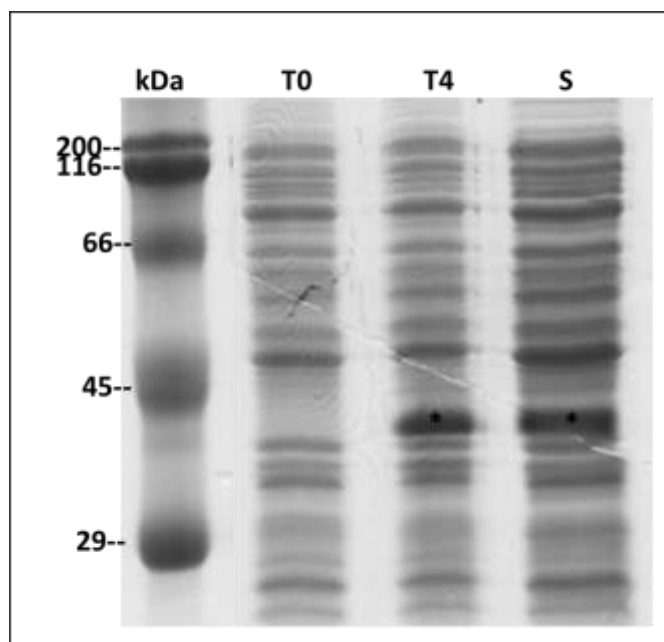


FIGURA 21- EXPRESSÃO EM LARGA ESCALA DA TOXINA LiRecDT7 EM CEPA BACTERIANA DE EXPRESSÃO *SHUFFLE*. A proteína foi expressa em 1 litro de cultura com 0,05mM de IPTG, à 30°C por 4h. À esquerda, indicado o marcador de massa molecular. Na sequência, o tempo anterior e após a indução da expressão (0h e 4h, respectivamente); o sobrenadante(S). Os asteriscos correspondem à banda da proteína recombinante na altura de aproximadamente 34.4kDa.

Não encontramos na literatura toxinas recombinantes expressas na cepa *E. coli* Shuffle. Tait & Straus (2011), verificaram uma melhora significativa da expressão na cepa *E. coli* Shuffle de uma proteína de membrana do vírus da herpes tipo-6 humano chamada de U24, em frente a outras cepas, como BL21 (DE3) e XL-Blue. Dentre as cepas de expressão utilizadas neste presente trabalho, escolhemos a cepa *E. coli* Shuffle, pois esta apresentou significativa

melhora na expressão da toxina recombinante LiRecDT7 em comparação com a cepa BL21(DE3)pLysS.

5.6 PURIFICAÇÃO DA LiRecDT7

A produção de grandes quantidades de proteína, na base de miligramas para estudos estruturais e funcionais, requer uma eficiente purificação (DONNELLY *et al.*, 2006). Normalmente, a purificação de proteínas é facilitada por adição de “*tags*” de fusão, que permite a purificação por cromatografia de afinidade a íons metálicos. Como já mencionado, a LiRecDT7 foi subclonada em vetor de expressão pET-14b, a fim de inserir na porção N-terminal a 6xHis-tag, com objetivo final de facilitar na etapa de purificação por cromatografia de afinidade com resina Ni⁺²-NTA agarose.

A partir da análise do gel SDS-PAGE 12,5% da purificação da LiRecDT7 (Figura 22), confirmamos que praticamente toda a proteína recombinante ligou-se na resina devido à sua ausência no “void”, e que provavelmente toda ela foi eluída da resina. No entanto, verifica-se que o eluato não está totalmente puro. A Figura 22 não evidencia as bandas que indicam a contaminação por proteínas bacterianas, entretanto, logo após o descoramento do gel, é perceptível a presença de três bandas nas alturas próximas de 45, 66 e 116 kDa, que podem representar tanto a presença de agregados da proteína recombinante quanto proteínas bacterianas contaminantes. Também é perceptível a presença de algumas bandas logo abaixo da banda correspondente à toxina LiRecDT7, as quais muito provavelmente representam contaminação por proteínas bacterianas.

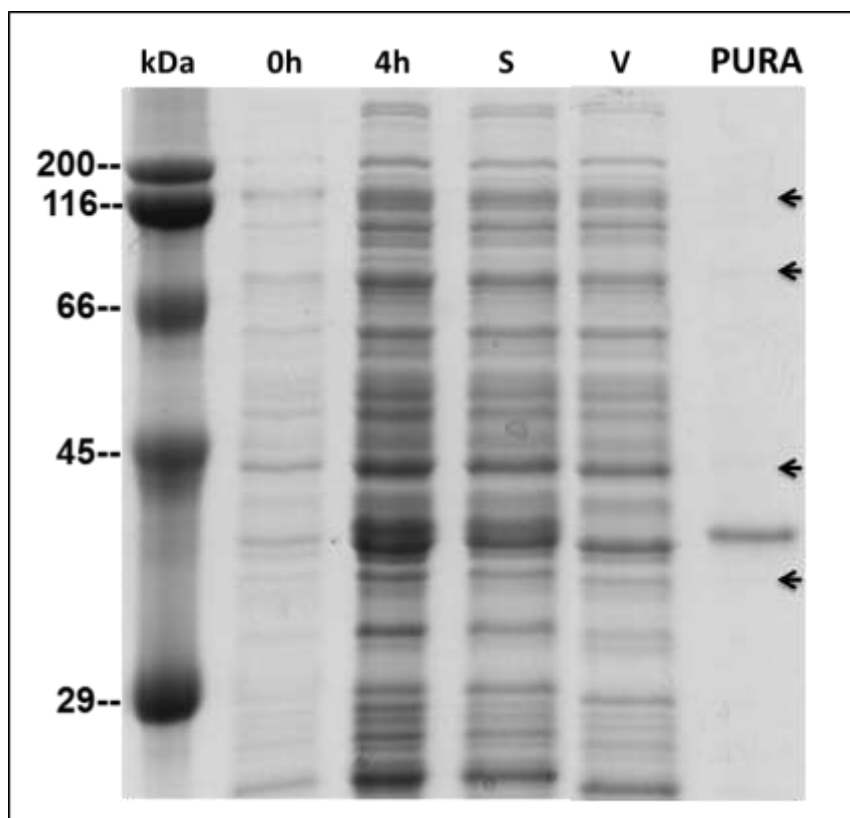


FIGURA 22- PURIFICAÇÃO DA TOXINA LiRecDT7 POR MEIO DE CROMATOGRRAFIA DE AFINIDADE EM RESINA Ni^{+2} - NTA AGAROSE. À esquerda, o marcador de massa molecular. Na sequência, os tempos antes a após a indução por IPTG (0h e 4h, respectivamente); o sobrenadante (S); em seguida, o void (V) e a proteína pura. As setas representam a posição das bandas de contaminantes ou, agregados da proteína recombinante.

A presença de contaminantes em preparados de proteínas recombinantes não é incomum. Usualmente é necessário estabelecer quais contaminantes não podem estar presentes, pois irão afetar os experimentos, e qual deve ser proporção da proteína em relação aos contaminantes. Purificações utilizando IMAC (*Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography*), como a cromatografia em resina Ni^{2+} -NTA agarose, geralmente geram produtos com pureza de 70 a 90%. É uma metodologia simples e rápida, com o resultado de um grau de pureza relativamente bom. A pureza da proteína recombinante produzida depende de diversos fatores como o tipo de célula em que a proteína foi expressa, condições cromatográficas como pH, concentração de sal e tensoativos, presença de proteínas que interajam com a matriz ou com o metal (CROWE et. al., 1995; GUPTAA et. al., 2003), ou mesmo uma baixa proporção da proteína recombinante na solução do lisado bacteriano.

Algumas estratégias foram usadas para tentar aumentar a pureza da proteína recombinante por cromatografia de afinidade em resina Ni^{2+} -NTA agarose. Primeiramente, foi padronizada a relação entre a quantidade de resina e de proteína recombinante. Um excesso de resina resulta em sítios livres para uma interação inespecífica com outras proteínas bacterianas. A melhor relação observada, resultando em uma proteína de maior pureza e menor perda da proteína no *void*, foi de 500 μL de resina Ni^{2+} -NTA para cada litro de cultura ressuspendido em 40 mL de tampão de ligação. O pH dos tampões da cromatografia pode ser um ponto chave na remoção de contaminantes, uma vez que pHs alcalinos (acima de 8,0) facilitam a interação de proteínas com o metal. Em pHs mais baixo, apenas proteínas que interagem fortemente com o metal permanecem ligadas. Sabendo que o pI da LiRecDT7 é de 5,14, todos os tampões utilizados no procedimento de purificação foram ajustados para pH 8,0, a fim de melhorar a pureza e também evitar a precipitação da proteína recombinante (SAMBROOK & RUSSEL, 2001; CUTLER, 2004).

Além dos cuidados descritos acima, a concentração de sal no tampão de cromatografia também influencia a força e especificidade da ligação. Altas concentrações impedem interações menos específicas, reduzindo a ligação de contaminantes. Foram utilizadas concentrações crescentes de imidazol no tampão de ligação, até um total de 30mM. Porém, concentrações mais altas de sal não reduziram a presença de contaminantes. Por fim, foram adicionados ao tampão de ligação, de lavagem e de eluição, um agente tensoativo que reduz interações hidrofóbicas e inespecíficas, e conseqüentemente, reduz a ligação dos contaminantes. O glicerol foi utilizado em todas as etapas da purificação na concentração de 10%, porém não foi efetivo na redução dos contaminantes bacterianos.

Como o objetivo de expressar proteína LiRecDT7 é utilizá-la em ensaios *in vitro* e *in vivo*, sua pureza deve estar em um nível aceitável (> 98%), uma vez que mesmo pequenas quantidades de contaminantes bacterianos podem interferir nos resultados de atividade biológica. A maioria dos autores que trabalha com a expressão de fosfolipases-D de *L. intermedia* recombinante não descreve problemas em sua purificação por cromatografia de afinidade, além

de obtê-la em quantidades significativas (CHAIM *et al.*, 2006). Como foram realizadas várias tentativas de purificação, conseguimos em média 0,2 mg/por litro de cultura de proteína pura, sendo este considerado um baixo rendimento em comparação com outras toxinas recombinantes purificadas pelo mesmo método. Como já citado, a isoforma LiRecDT1 possui em média, um rendimento de 24mg/ por litro de cultura de proteína pura, considerado como um alto rendimento (CHAIM *et al.*, 2006). Para as outras isoformas, como a LiRecDT6, possui um rendimento de 2,9mg/ por litro de cultura, considerado um bom rendimento (APPEL *et al.*, 2008). Era esperado que a LiRecDT7 mostrasse um rendimento semelhante com as outras isoformas, principalmente com a isoforma LiRecDT6, devido a sua alta identidade aminoacídica.

5.7 ENSAIO DE ATIVIDADE ESFINGOMIELINÁSICA

Após várias tentativas de obtenção da LiRecDT7 pura e em quantidade suficiente para a realização de testes biológicos, resolvemos fazer um ensaio piloto para verificar se a toxina recombinante obtida possuía a atividade esfingomielinásica, logo verificar se esta se encontrava ativa. O resultado está demonstrado na figura 23, onde verificamos que a LiRecDT7 foi capaz de hidrolisar a esfingomielina, mostrando também que a sua atividade é concentração dependente, demonstrando que esta isoforma provavelmente pertence a esta família de toxina.

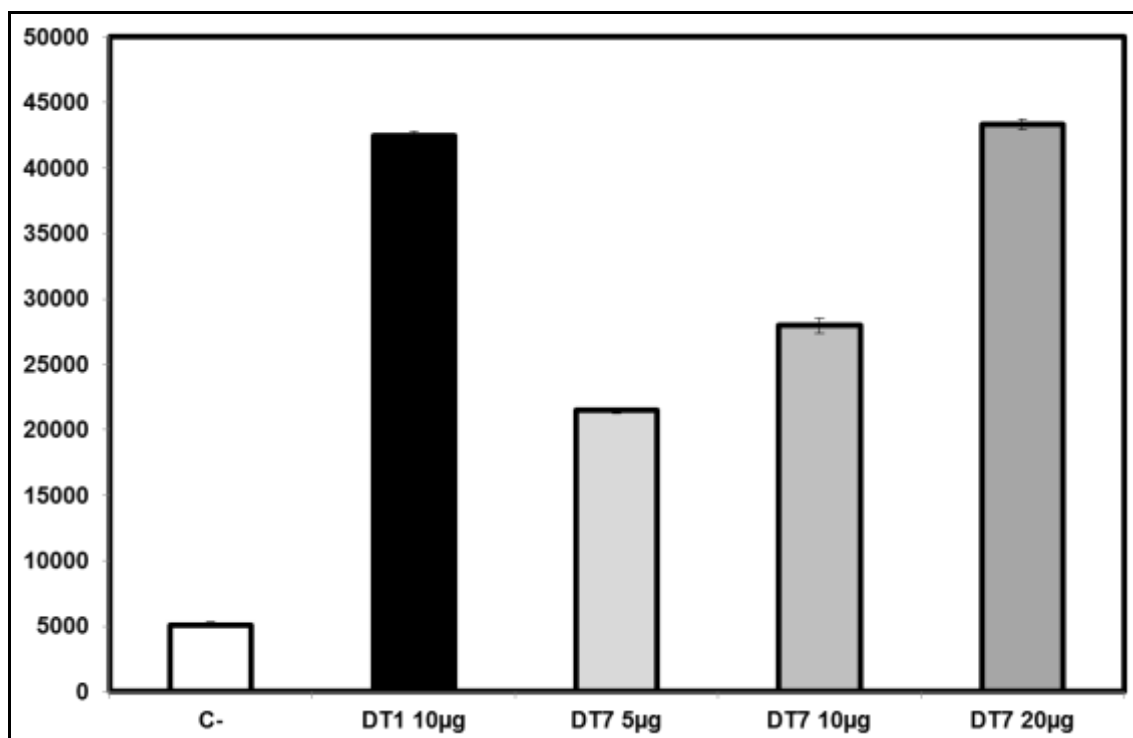


Figura 23- ENSAIO DE ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA DA LiRecDT7. A atividade esfingomielinásica foi avaliada através do kit Amplex Red Assay à 37°C por 30 minutos, sendo o produto da reação determinada em 540nm, com detecção de emissão à 590nm. A toxina recombinante LiRecDT1 foi utilizada como controle positivo, e o controle negativo apenas o reagente Amplex Red. As concentrações da LiRecDT7 utilizadas foram 5, 10 e 20µg. O experimento foi realizado em triplicata e os valores dados pela média \pm SEM expressos em porcentagem. A significância é definida como *** $p \leq 0,001$.

Extrapolando os dados de atividade enzimática das toxinas recombinantes realizados por Chaves-Moreira *et al.* (2011), com cálculos aproximados, as análises mostram que a isoforma LiRecDT7 possui uma atividade enzimática de 3 a 4 vezes maior que as isoformas LiRecDT3 e LiRecDT5, e de 2 a 3 vezes menor que a LiRecDT1, LiRecDT4 e LiRecDT5. Por mais que a LiRecDT7 possua alta identidade aminoacídica com a LiRecDT6 (71%), não verificamos semelhança nas suas atividades enzimáticas, na qual a LiRecDT6 possui alta atividade esfingomielinásica (APPEL *et al.*, 2008; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011). No entanto, os resultados mostram que a LiRecDT7 possui uma atividade enzimática maior que as isoformas LiRecDT3 e LiRecDT4 que possuem uma baixa atividade (da SILVEIRA *et al.*, 2006a; 2006b; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011). O alinhamento da LiRecDT7 mostra uma substituição conservativa nos resíduos

de aminoácidos Asp233→Glu233, no qual possui papel importante no sítio catalítico das fosfolipases-D. Esta substituição mostrou não interferir na atividade catalítica da isoforma LiRecDT7, uma vez que outras isoformas como a LiRecDT3 e LiRecDT5 que possuem os aminoácidos do sítio catalítico conservados mostraram uma atividade esfingomielinásica baixa.

Estes resultados reforçam que a LiRecDT7 provavelmente é uma nova isoforma de fosfolipase-D presente no veneno de *L. intermedia*, no entanto, devemos otimizar a purificação desta proteína de forma que nenhum tipo de contaminante interfira nos resultados de atividade biológica. Vale ressaltar que este ensaio de atividade esfingomielinásica apenas mostrou resultados preliminares, que posteriormente serão repetidos.

Recentemente, Chaim e colaboradores (2011b) demonstraram que fosfolipases-D recombinante de *L. intermedia* também hidrolisam esfingomielina, além de hidrolisar fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilcolina assimétrico, fosfatidilserina, lisofosfatidilcolina. Chaves-Moreira *et al.*, 2011 verificou que isoforma LiRecDT1 de *L. intermedia* foi capaz de hidrolisar os lipídeos sintéticos esfingomielina, lisofosfatidilcolina e fator de ativação plaquetária (*lyso*), e também lipídeos obtidos da membrana plasmática de eritrócitos humanos. Através desses estudos, a denominação desta enzima como esfingomielinase não é mais apropriada, já que esta é capaz de hidrolisar um amplo espectro de fosfolipídeos (LEE e LYNCH, 2005; CHAIM *et al.*, 2011b; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011).

É de conhecimento que a atividade das fosfolipases-D sobre esfingomielina gera colina e ceramida-1-fosfato, e quando catalisa lisofosfatidilcolina gera colina e ácido lisofosfatídico (LEE e LYNCH, 2005). Todos esses produtos são moléculas bioativas relacionadas com funções biológicas como sobrevivência, resposta inflamatória, divisão celular, apoptose, proliferação celular, agregação plaquetária e hemólise (CHALFANT e SPIEGEL, 2005; OHANIAN AND OHANIAN, 2001; YANG *et al.*, 2000).

Os resultados até o momento mostram que esta toxina está ativa e que é capaz de hidrolisar esfingomielina. Embora muitos experimentos de cunho bioquímico e biológico devam ainda ser realizados para confirmar que esta pertence realmente à família de toxinas das fosfolipases-D. Como demonstrado

em vários estudos, as fosfolipases-D possuem papel importante dentro do quadro clínico do loxoscelismo, e que isoladamente são capazes de causar quase todos os efeitos biológicos do acidente. Sabemos também que esta família é capaz de causar dermonecrose em humanos e em coelhos, sendo que muitas vezes as fosfolipases-D também são chamadas de toxinas dermonecróticas. Assim, os próximos passos, além da otimização da pureza, é a realização de experimentos de dermonecrose em animais, edema, permeabilidade vascular, agregação plaquetária, hemólise, nefrotoxicidade e citotoxicidade, para compreendermos o papel desta toxina dentro do quadro do acidente.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível obter a sequência completa, a clonagem e a expressão de uma nova isoforma de fosfolipase-D presente no veneno de *L. intermedia*. Com a sequência nucleotídica e aminoacídica, foi possível fazer análises usando ferramentas de bioinformática e comparando-a frente a bancos de dados. A partir disso, foi visto que a LiRecDT7 possui identidade com várias proteínas pertencentes à família das fosfolipases-D de diferentes espécies do gênero *Loxosceles*. Estes resultados sugerem que esta proteína provavelmente é uma nova isoforma de fosfolipase-D. As análises também revelaram que esta nova isoforma possui uma substituição conservativa no resíduo Asp233→Glu233 na sequência, sendo que este resíduo possui papel na formação de pontes de hidrogênio que auxilia na estabilização da estrutura da proteína. Até o momento, podemos propor que esta substituição não interferiu atividade esfingomielinásica.

Os resultados da expressão mostram que a maior parte desta proteína recombinante está sendo expressa na forma de agregados protéicos de corpos de inclusão. A pequena fração expressa na forma solúvel foi submetida a padronização de purificação, mostrando que a maior fração da proteína da encontra-se pura. Mesmo assim, concluímos que muito pode-se fazer para melhorar as condições de expressão e purificação desta.

Através do teste piloto de atividade esfingomielinásica, observamos que esta isoforma possui atividade fosfolipásica, embora este resultado deva ser confirmado, em vez que esta toxina não se encontra totalmente pura. Além da esfingomielinina, podemos testar a sua atividade com outros fosfolipídeos.

Com esta toxina pura e em grande quantidade, a perspectiva deste trabalho se torna em caracterizá-la melhor bioquimicamente, testando a sua atividade enzimática, sua capacidade, efetividade e especificidade de hidrólise quanto a diferentes substratos. Caracterização desta proteína em experimentos de cunho biológico para entendimento molecular do seu envolvimento no quadro clínico cutâneo e sistêmico provocado pelo veneno (estudo de sinergismo com outras toxinas loxoscélicas, estudo das alterações de

permeabilidade capilar, edema, agregação plaquetária, entre outros e quanto aos inibidores testar sua interação, potencial *in vivo* e toxicidade).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Quinta Edição. Porto Alegre: Artmed, 2008.

ANDRADE, R.M.G.; OLIVEIRA, K.C.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D.; TAMBOURGI, D.V. Ontogenetic development of *L. intermedia* spider venom. **Toxicon**, v. 37, p. 627-632, 1999.

ANDRADE, S. A; MURAKAMI, M.T; CAVALCANTE D. P; ARNI, R. K; TAMBOURGI, D. V. Kinetic and mechanistic characterization of the Sphingomyelinases- D from *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v.47, p. 380–386, 2006.

APPEL, M.H.; DA SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, G.; VEIGA, S.S. Insights into brown spider and loxoscelism. **Invertebrate Survival Journal**, v. 2, p. 52-158, 2005.

APPEL, M.H.; da SILVEIRA R.B.; CHAIM, O.M.; PALUDO, K.S.; SILVA, D.T.; CHAVES, D.M.; da SILVA, P.H.; MANGILI, O.C.; SENFF-RIBEIRO, A.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Identification, cloning and functional characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase-D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochimica et biophysica acta**, v.1780, p.167-178, 2008.

ATKINS, J. A.; WINGO, C. W.; SODEMAN, W. A.; FLYNN, J. E. Necrotic arachnidism. **Am J Trop Med Hyg**, v. 7, p. 165–184, 1958.

BARBARO, K.C.; EICKSTEDT, V.R.D.; MOTA, I. Adjuvant effect of *Loxosceles gaucho* (South American brown spider) venom. **Toxicon**, v. 32, p. 687-693, 1994.

BARBARO, K. C.; SOUSA, M. V.; EICKSTEDT, V. R.; MOTA, I. Compared chemecal properties of dermonecrotic and lethal toxins from spiders of the genus *Loxosceles* (Araneae). **J. Protein Chem.**, v. 15, p. 337-343, 1996.

BARBARO, K.C.; KNYSACK, I.; MARTINS, R.; HOGAN, C.; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, v.45, p.489-499, 2005.

BERTANI, R.; FUKUSHIMA, C. S.; NAGAHAMA, R. H. *Loxosceles chapadensis* (Araneae: Sicariidae): a new recluse spider species of the *gaucho* group from Brazil. **The Journal of the Arachnology**, v.38, p. 364-367, 2010.

BETTS, M. J.; RUSSEL, R. B. Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions. In: M.R. Barnes; I.C. Gray. Heidelberg: John Wiley & Sons, Ltd, 2003, p. 289, 316.

BINFORD, G. J.; CORDES, M. H. J.; WELLS, M. A. Sphingomyelinase D from venoms of *Loxosceles* spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure. **Toxicon**, v. 45, p. 547-560, 2005.

BINFORD, G. J.; CALLAHAN, M. S.; BODNER, M. R.; RYNERSON, M. R.; NÚÑES, P. B.; ELLISON, C. E.; DUNCAN, R. P. Phylogenetic relationships of *Loxosceles* and *Sicarius* spiders are consistent with Western Gondwanan vicariance. **Mol Phylogenet and Evol.**, v. 48, p. 538-553, 2008.

BINFORD, G. J.; BODNER, M. R.; CORDES, M. H. J.; BALDWIN, K. L.; RYNERSON, R.; BURNS, S.; ZOBEL-THROPP, P. A. Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase-Din siicariid spider venoms. **Mol. Biol. and Evol.**, v. 26, p. 547-566, 2009.

BRADFORD, M.M.; A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Bioch.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRODYK, W. H. Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein. **Methods Enzymol.**, v. 463, p. 131-147, 2009.

CARDOSO, F. C.; PACIFICO, L. G.; CARVALHO, D. C.; VICTORIA, J. M.; NEVES, A. L.; CHAVÉZ-OLORTEGUI, C.; GOMEZ, M.V.; KALAPHOTAKIS, E. Molecular cloning and characterization of *Phoneutria nigriventer* toxins active on calcium channels. **Toxicon**, v. 41, p. 755-763, 2003.

CATALÁN, A.; CORTES, W.; SAGUA, H.; GONZÁLEZ, J.; ARAYA, E. Two New Phospholipase D Isoforms of *Loxosceles laeta*: Cloning, Heterologous Expression, Functional Characterization, and Potential Biotechnological Application. **J Biochem Mol Toxicol.**, v. 00, p. 1-11, 2011.

CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; da SILVEIRA, R.B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S.; Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol App Pharmacol.**, v. 221, p. 64- 77, 2006.

CHAIM, O. M.; TREVISAN-SILVA, D.; CHAVES-MOREIRA, D.; WILLE, A. C.M.; FERRER, V. P.; MATSUBARA, F. H.; MANGILI, O. C.; DA SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. Brown Spider (*Loxosceles* genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes. **Toxins**, v. 3, p. 309-344, 2011a.

CHAIM, O.M.; da SILVEIRA, R.B.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V.P.; SADE, Y.B.; BÓIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L.H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; TAKAHASHI, H.K.; TOLEDO, M.S.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: Endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **BBA Mol. Cell Biol. Lipids** **2010**, v. 1811, p. 84–96, 2011b.

CHAVES-MOREIRA, D.; CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; PALUDO, K.S.; GREMSKI, L.H.; DONATTI, L.; DE MOURA, J.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; da SILVEIRA, R.B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S.S. Identification of a direct hemolytic effect dependent on the catalytic activity induced by phospholipase-D (dermonecrotic toxin) from brown spider venom. **J. Cell. Biochem.**, v. 107, p. 655–666, 2009.

CHAVES-MOREIRA, D.; SOUZA, F. N.; FOGAÇA, R. T.H.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S.S. The Relationship Between Calcium and the Metabolism of Plasma Membrane Phospholipids in Hemolysis Induced by Brown Spider Venom Phospholipase-D Toxin. **J. Cell. Biochem.**, v. 112, p. 2529-2540, 2011.

CHALFANT, C. E.; SPIEGEL, S. Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. **J Cell Sci.**, v. 118, p. 4605-4612, 2005.

CHOMEZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **BioTechniques**, England, v.15, p.532-534, 1993.

CROWE, J.; MASONE, B. S.; RIBBE, J. One-Step Purification of Recombinant Proteins with the 6xHis Tag and Ni-NTA Resin. In: HARWOOD, A. J. **Methods in Molecular Biology**. 1995, p. 491- 510.

CUTLER, P. Affinity Chromatography. In: CUTLER, P. Protein Purification Protocol. New Jersey: Humana Press, 2004, p. 139-150.

da SILVA, P.H.; SILVEIRA, R.B.; APPEL, M.H.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, v. 44, p. 693-709, 2004.

da SILVEIRA, R.B.; PIGOZZO, R.B.; CHAIM, O.M.; APPEL, M.H.; DREYFUSS, J.L.; TOMA, L.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom gland. **Biochimie**, v.88, p. 1241 – 1253, 2006a.

da SILVEIRA, R.B.; PIGOZZO, R.B.; CHAIM, O.M.; APPEL, M.H.; SILVA, D.T.; DREYFUSS, J.L.; TOMA, L.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, W. Two novel dermonecrotic toxins from brown spider (*Loxosceles*

intermedia) venom: from cloning to functional characterization. **Biochimie**, v. 89, p. 289 – 300, 2006b.

da SILVEIRA, R. B.; WILLE, A. C.; CHAIM, O. M.; APPEL, M. H.; SILVA, D. T.; FRANCO, C. R.; TOMA, L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C. P.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Biochem J**, v. 406, p. 355-363, 2007a.

da SILVEIRA, R.B.; CHAIM, O.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-b-N-acetyl-D-hexosaminidases hydrolases. **Toxicon**, v.49, p.758-768, 2007b.

de ANDRADE, S. A.; FERNANDES-PEDROSA, M.; ANDRADE, R. M. G.; OLIVA, M. L.V.; VAN DER BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. Conformational changes of *Loxosceles* venom sphingomyelinases monitored by circular dichroism., **Bioch and Biophysical Research Communications**, v. 327, p. 117-123.

de CASTRO, S.C.; SILVESTRE, F.G.; ARAÚJO, S.C.; YAZBEC, G.M.; MANGILI, O. C.; CRUZ, I.; CHAVES-OLÓRTEGUI, C.; KALAPOTHAKIS, I. Identification and molecular cloning of insecticidal toxins from the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia*, **Toxicon**, v.44, p.273-280, 2004.

de SOUZA, A. L.; MALAQUE, C., M.; SZTAJNBOK, J.; ROMANO, C. C.; DUARTE, A. J.; SEGURO, A. C.; *Loxosceles* venom-induced cytokine activation, hemolysis, and acute kidney injury. **Toxicon**, v. 51, p. 151-156, 2008.

dos SANTOS, V. L.; FRANCO, C. R.; VIGGIANO, R. L.; da SILVEIRA, R. B.; CANTÃO, M. P.; MANGILI, P. C.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, W. Structural and ultrastructural description of the venom gland of *Loxosceles intermedia*. **Toxicon**, v. 38, p. 265-285, 2000.

dos SANTOS, L. D.; DIAS, N. B.; JOSÉ ROBERTO, A. S. P.; PALMA, S. M.; Brown Recluse Spider Venom: Proteomic Analysis and Proposal of a Putative Mechanism of Action. **Protein and Peptide Letters**, v. 16, p. 933-943, 2008.

DONNELLY, M. I.; ZHOU, M.; MILLARD, C. S.; CLANCY, S.; STOLS, L.; ESCHENFELD, W. H.; COLLART, F. R.; JOACHIMIAK, A. An expression vector tailored for large-scale, high-throughput purification of recombinant protein. **Protein Expression and Purification**, v. 47, p. 446-454, 2006.

ESCOUBAS, P. Molecular diversification in spider venoms: A web of combinatorial peptide libraries. **Mol. Divers.**, v. 10, p. 545-554, 2006.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; ELIAS, M. C.; GRANER, E., MANGILI, O. C.; BRENTANI, R. R. Detection and characterization of

metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v. 36, p. 1039-1051, 1998.

FERNANDES-PEDROSA, M. F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO I. L. M.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; VAN DEN BERG, C. W.; RAMOS, C. R.; HO, P. L.; TAMBOURGI, D. V. Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 298, p. 638-645, 2002.

FERNANDES-PEDROSA, JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; KOBASHI, L. S.; ALMEIDA, D. D.; HO, P. L.; TAMBOURGI, D. V.; Transcriptome analysis of *Loxosceles laeta* (Araneae, Sicariidae) spider venomous gland using expressed sequence tags. **Genomics**, v. 9, p. 1-12, 2008.

FERRARA, G. I. S.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; PORTARO, F. C. V.; MANZONI-DE-ALMEIDA, D.; MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K.; VAN DEN BERG, C. W.; HO, P. L.; TAMBOURGI, D. V. SMase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: Molecular cloning, expression, function and structural analysis. **Toxicon**, v. 53, p. 743-753, 2009.

FISCHER, M.L.; VASCONCELLOS-NETO, J. Microhabitats occupied by *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* (Araneae: Sicariidae) in Curitiba, Paraná, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.42, p. 756-765, 2005.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **The American journal of the medical sciences**, v. 304, p.261-267, 1992.

GEREN, C.R.; CHAN, T.K.; HOWELL, D.E.; ODELL, G.V. Isolation and characterization of toxins from brown recluse spider venom (*Loxosceles reclusa*). **Archives of biochemistry and Biophysics**, v.174, p.90-99, 1976.

GILBERT, S.F. **Embriology**. Constructing the organism. Ed. S. F. Gilbert and A. M. Raunio, Sinauer, Sunderland, 1997.

GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O.M.; PROBST, C. M.; FERRER, V. P.; NOWATZKI, J.; WEINSCHUTZ, H.C.; MADEIRA, H.M.F.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S.S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular Biosystems**, v. 12, p. 2403-2416, 2010.

GIUSEPPE, P. O.; ULLAH, A.; TREVISAN-SILVA, D.; GREMSKI, L. H.; WILLW, A. C. M.; CHAVES-MOREIRA, D.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; MURAKAMI, M. T.; VEIGA, S.S.; ARNI, R. K.; Structure of a novel class II phospholipase D: Catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 409, p. 622-627, 2011.

GUPTA, V.; ESHWARI, A. N. S.; PANDA, A. K.; AGARWAL, G. P. Optimization of immobilized metal ion affinity chromatography for single-step purification of recombinant ovine growth hormone expressed in *Escherichia coli*. **J. of Chromatography**, v. 998, p. 93-101, 2003.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. CSHL Press. 1. ed. New York, 1988.

HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K.; Loxoscelism: Old obstacles, New directions. **Annals of emergency medicine**, v. 44, p. 608-624, 2004.

ISBISTER, G. K.; WHITE, J. Clinical consequences of spider bites: recent advances in our understanding. **Toxicon**, v. 43, p. 477- 492, 2004.

ISBISTER, G. K.; FAN, H. W. Spider bite. **Lancet**, v. 378, p. 2039-2047, 2011.

KADOKURA, H.; KATZEN, F.; BECKWITH, J. Protein disulfide bond formation in Prokaryotes. **Annu. Rev. Biochem**, v. 72, p. 111-135, 2003.

KALAPOTHAKIS, E.; PENAFORTE, C. L.; BEIRÃO, P. S.; ROMANO-SILVA, M. A.; CRUZ, J. S.; PRADO, M. A.; GUIMARÃES, P. E.; GOMEZ, M. V.; PRADO, V. F. Cloning of cDNA's encoding neurotoxic peptides from the spider *Phoneutria nigriventer*. **Toxicon**, v. 36, p. 679-685, 1998.

KALAPOTHAKIS, E., ARAUJO, S. C., DE CASTRO, C. S., MENDES, T. M., GOMEZ, M. V., MANGILI, O. C., GUBERT, I. C. & CHAVEZ- OLORTEGUI, C. Molecular cloning, expression and immunological properties of LiD1, a protein from the dermonecrotic family of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, v. 40, p. 1691-1699, 2002.

KALAPOTHAKIS, E., CHATZAKI, M., GONCALVES-DORNELAS, H., DE CASTRO, C. S., SILVESTRE, F. G., LABORNE, F. V., DE MOURA, J. F., VEIGA, S. S., CHAVEZ-OLORTEGUI, C., GRANIER, C. and BARBARO, K. C. The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* (Mello-Leitao) venom. **Toxicon**, v. 50, p. 938-946, 2007.

KUSMA, J.; CHAIM, O.M.; WILLE, A.C.M.; FERRER, V.; SADE, Y.B.; DONATTI, L.; GREMSKI, W.; MANGILI, O.C.; VEIGA, S.S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimie.**, v. 90, p. 1722- 1736, 2008.

LEE, S.; LYNCH, K.R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochem. J**, v. 391, p. 317–323, 2005.

LUCATTO, R. V.; ABDULKADER, R. C.R.M.; BARBARO, K. C.; MENDES, G. E.; CASTRO, I.; BAPTISTA, M. A. S. F.; CURY, P. M.; MALHEIROS, D. M. C.; SCHOR, N.; YU, L.; BURDMANN, E. A. *Loxosceles gaucho* Venom-Induced

Acute Kidney Injury – In Vivo and In Vitro Studies. **PLoS Neglected Tropical diseases**, v. 5, p. 1-5, 2011.

LUCIANO, M.N.; da SILVA, P.H.; CHAIM, O.M.; SANTOS, V.P.; FRANCO, C.R.C.; SOARES, M.F.S.; ZANATA, S.M.; MANGILI, O.; GREMSKI, O.C. VEIGA, S.S. Experimental evidence for a direct cytotoxicity of *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom on renal tissue. **The Journal of histochemistry and cytochemistry**, United States, v.52, p.455-467, 2004.

MACHADO, L. F., LAUGESSEN, S., BOTELHO, E. D., RICART, C. A., FONTES, W., BARBARO, K. C., ROEPSTORFF, P. & SOUSA, M. V. Proteome analysis of brown spider venom: identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics**, v. 5, p. 2167-2176, 2005.

MAKRIS, M.; SPANOUDAKI, N.; GIANNOULA, F.; CHLIVA, C.; ANTONIADOU, A.; KALOGEROMITROS, D. Acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP) triggered by a spider bite. **Allergol Int.**, v. 58, p. 301-3, 2009.

MARCHESINI, N.; HANNUN, Y.A. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. **Biochem. Cell Biol**, v. 82, p. 27–44, 2004.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M.L. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v.38, p.331-335, 2005.

MINISTERIO DA SAÚDE – Fundação Nacional da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2a. ed., Brasília, 45-58, 2001.

MOTA, I.; BARBARO, K. C. Biological and Biochemical Properties of Venom from Medically Important *Loxosceles* (Araneae) species in Brazil. **J. Toxicol.**, v. 14, p. 401-421, 1995.

MONTEIRO, C. L. B.; RUBEL, R.; COGO, L. L.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; Isolation and identification of *Clostridium perfringens* in the venom and fangs of *Loxosceles intermedia* (brown spider): enhancement of the dermonecrotic lesion in loxoscelismo. **Toxicon**, v. 40, p. 409-418, 2002.

MURAKAMI, M.T.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; TAMBOURGI, D.V.; ARNI, R.K. Structural Basis for Metal-Ion Coordination and the Catalytic Mechanism of Sphingomyelinases D. **J Biol Chem**, v. 280, p. 13658-13658, 2005.

MURAKAMI, M.T.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; ANDRADE, S.A.; GABDOULKHAKOV, A.; BETZEL, C.; TAMBOURGI, D.V.; ARNI, R.K. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. **Biochem Biophys Res Comm**, v. 342, p. 323–329, 2006.

OHANIAN, J; OHANIAN, V. Sphingolipids in mammalian cell signalling. **Cell Mol Life Sci.**, v. 58, p.205320-68, 2001.

OLIVEIRA, K.C.; ANDRADE, R.M.G.; GIUSTI, A.L.; SILVA, W.D; TAMBOURGI, D.V. Sexlinked variation of *Loxosceles intermedia* spider venoms. **Toxicon**, v.37, p.217-221,1999.

OLIVEIRA, K. C.; GONÇALVES-ANDRADE, R.; PIAZZA, R. M. F.; FERREIRA-JUNIOR, J. M. C.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon**, v. 45, p. 421-429, 2005.

OSPEDAL, K. Z., APPEL, M. H., FILLUS NETO, J., MANGILI, O. C., SANCHES VEIGA, S.; GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Int J Exp Pathol**, v.83, p. 287-294, 2002.

PALUDO, K. S.; BISCAIA, S. M.; CHAIM, O. M.; OTUKI, M. F.; NALIWAICO, K.; DOMBROWSKI, P. A.; FRANCO, C. R.; VEIGA, S. S. Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: a pharmacological investigation. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 149, p. 323-333, 2009.

PAULI, I.; PUKA, J.; GUBERT, I. C.; MINOZZO, J. C.; The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment. **Toxicon**, v. 48, p. 123-137, 2006.

PAULI, I.; MINOZZO, J.C.; DA SILVA, P. H.; CHAIM, O., M.; VEIGA, S. S. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brown spider (*Loxosceles intermedia*). **Toxicon**, v. 53, p. 660-671, 2009.

PETERSON, M. E. Brown spider envenomation. **Clin Tech Small Anim Pract**, v. 21, p. 191-193, 2006.

PIPPIRS, U.; MEHLHORN, H.; ANTAL, A.S.; SCHULTE, K.W.; HOMEY, B. Acute generalized exanthematous pustulosis following a *Loxosceles* spider bite in Great Britain. **Br J Dermatol**, v. 16, p.208-9, 2009.

PLATNICK, N.I. The world spider catalog, version 12.5. American Museum of Natural History, 2012. Disponível em: <<http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/INTRO1.html>> acesso em: 26/01/2012.

RAMOS-CERRILLO, B., OLVERA, A., ODELL, G. V., ZAMUDIO, F., PANIAGUA-SOLIS, J., ALAGON, A. & STOCK, R. P. Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. **Toxicon**, v. 44, p. 507-514, 2004.

RASH, L.D.; HODGSON W.C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. **Toxicon**, v. 40, p. 225-254, 2002.

RIBEIRO, R. O. S.; CHAIM, O. M.; daSILVEIRA, R. B.; GREMSKI, L. H.; SADE, Y. S.; PALUDO, K. S.; SENFF-RIBEIRO, A.; MOURA, J.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S.; Biological and structural comparison of recombinant phospholipase D toxins from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v. 50, p. 1162-1174, 2007.

ROSENFELD, G.; NAHAS, L.; CILLO, D. M.; FLEURY, C. T. **Envenenamentos por serpentes, aranhas e escorpiões**. In: F.C. Prado, Editor, Atualização Terapêutica, Livraria Luso Espanhola e Brasileira, Rio de Janeiro, p.931–944, 1957.

SAHDEV, S.; KAHTTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Mol Cell Biochem**, v. 307, p. 249-264, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. 3th. Ed. New York; Cold Spring Harbour, 2001.

SAMS, H.H.; DUNNICK, C.A.; SMITH, M.L.; KING, L.E. Necrotic arachdism. **J Am Acad Dermatol**, v. 44, p. 61-573, 2001.

SENFF-RIBEIRO, A.; HENRIQUE DA SILVA, P.; CHAIM, O. M.; GREMSKI, L. H.; PALUDO, K. S.; BERTONI DA SILVEIRA, R.; GREMSKI, W.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. **Biotechnol Adv**, v.26, p.210-218, 2008.

SINAN - SISTEMA NACIONAL DE NOTIFICAÇÕES DE AGRAVOS, Ministério da Saúde, BRASIL, 2012. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>> acesso em: 08/01/2012.

SOLLOD, B. L.; WILSON, D.; ZHAXYBAYEVA, O; GOGARTEN, J, P.; DRINKWATER, R.; KING, G. F. Were arachnids the first to use combinatorial peptide libraries? **Peptides**, v. 46, p. 927-936, 2005.

SORENSEN, P. H.; MORTENSEN, K. K.; Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 113-128, 2005.

SWANSON, D.L.; VETTER, R.S. Loxoscelism. **Clinics in dermatology**, v.24, p.213-221, 2006.

TAIT, A. R.; STRAUS, S. K. Overexpression and purification of U24 from human herpesvirus type-6 in *E. coli*: unconventional use of oxidizing environments with a maltose binding protein-hexahistidine dual tag to enhance membrane protein yield. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 1-12, 2011.

TAMBOURGI, D. V., MORGAN, B. P., DE ANDRADE, R. M., MAGNOLI, F. C. & VAN DEN BERG, C. W. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **Blood**, v. 95, p. 683-691, 2000.

TAMBOURGI, D. V., DE, F. F. P. M., VAN DEN BERG, C. W., GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M., FERRACINI, M., PAIXAO-CAVALCANTE, D., MORGAN, B. P. & RUSHMERE, N. K. Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from *Loxosceles* venom glands. **Mol Immunol**, v. 41, p. 831-840, 2004.

TAMBOURGI, D. V., GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M. and VAN DEN BERG, C. W. Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies. **Toxicon**, v. 56, p. 1113-1119, 2010.

TREVISAN-SILVA, D.; GREMSKI, L. H.; CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; MEISSNER, O. M.; MANGILI, O. C.; BARBARO, K. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S. S.; SENFF-RIBEIRO, A. Astacin-like metalloproteases are a gene family of toxins present in the venom of different species of the brown spider (genus *Loxosceles*). **Biochimie**, v.92, p.21-32, 2010.

VEIGA, S.S.; GREMSKI, W.; SANTOS, V.L.P.; FEITOSA, L.; MANGILI, O.C.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.R. Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence on glycosylation for dermonecrotic activity. **Toxicon**, England, v. 37, p.587-607, 1999.

VEIGA, S.S.; da SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L.; HAOACH, J.; PEREIRA, A.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Identification of high molecular weight serineproteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, v.38, p.825-839, 2000.

VENTURA, S.; VILLAVARDE, A. Protein quality in bacterial inclusion bodies. **Trends in Biotechnology**, v.24, p. 179-185, 2006.

VETTER, R.S.; ISBISTER, G.K. Medical aspects of spiders bites. **Ann Rev of Entomol.**, v. 53, p. 409-429, 2008.

YANG, L.; ANDREWS, D. A.; LOW, P. S. Lysophosphatidic acid opens a Ca(++) channel in human erythrocytes. **Blood.**, v. 95, p. 2420-2425, 2000.

YANG, Q.; XU, J.; LI, M.; LEI X.; AN, L. High-level expression of a soluble snake venom enzyme, glosheobin, in *E. coli* in the presence of metal ions. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 607-610, 2003.

ZHANG, L.; CHOU, C. P.; MO-YOUNG. Disulfide bond formation and its impact on the biological activity and stability of recombinant therapeutic proteins

produced by *Escherichia coli* expression system. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 923-929, 2011.